

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

**DOTTORATO DI RICERCA IN ACQUACOLTURA E
PRODUZIONI MARINE E DULCIACQUICOLE**

XVII CICLO

**Approcci genetici al metabolismo del ferro durante lo sviluppo
dei pesci: studio dei geni *soul/heme binding protein* in
*Danio rerio***

Coordinatore
Ch.mo Prof. Aldo Bordi

Candidata:
Dott.sa Gerarda Sorrenti

Docente Guida:
Dott. Paolo Sordino

Anno Accademico 2004/2005

INDICE

INTRODUZIONE

| | |
|---|---------|
| Acquicoltura | pag. 3 |
| Quantitative Trait Locus: QTL | pag. 5 |
| Ferro: un nutriente essenziale | pag. 8 |
| <i>Danio rerio</i> -zebrafish: sistema modello genetico e di sviluppo | pag. 19 |

| | |
|----------------------------|---------|
| SCOPO DELLA RICERCA | pag. 27 |
|----------------------------|---------|

MATERIALI E METODI

| | |
|---|---------|
| Clonaggio di <i>soula</i> in p <i>Bluescript</i> KS II- vector | pag. 30 |
| Clonaggio di <i>soula</i> pCR [®] II-TOPO [®] | pag. 33 |
| Trasformazione di DNA plasmidico in cellule batteriche con elettroporazione | pag. 35 |
| Minipreparazione di DNA plasmidico | pag. 35 |
| Maxpreparazione di DNA plasmidico | pag. 36 |
| Sintesi degli oligonucleotidi | pag. 38 |
| Sequenziamento del DNA plasmidico | pag. 38 |
| Analisi delle sequenze | pag. 38 |
| Preparazione di RNA totali da embrioni e tessuti di <i>Danio rerio</i> | pag. 39 |
| Sintesi del cDNA | pag. 42 |
| Amplificazione mediante PCR | pag. 42 |

| | |
|--|----------|
| Trascrizione in vitro di mRNA | pag. 44 |
| Quantizzazione delle sonde ad RNA | pag. 46 |
| Ibridazione in situ whole mount | pag. 48 |
| Microiniezioni di oligonucleotidi antisenso (morpholino) | pag. 49 |
| Colorazione della emoglobina embrionale sui morfanti con o-dianisidina | pag. 54 |
| Embrioni di Zebrafish mutanti | pag. 55 |
| TABELLE DELLE SOLUZIONI | pag. 57 |
| RISULTATI | pag. 64 |
| Analisi della RT-PCR di <i>soulA</i> | pag. 70 |
| Espressione spaziale di <i>soulA</i> | pag. 73 |
| Espressione spaziale di <i>soulB</i> | pag. 76 |
| Microiniezione di oligonucleotidi antisenso Morpholino (MO) | pag. 81 |
| ISH di <i>soul/hbp</i> su embrioni mutanti di geni eritrogenetici | pag. 84 |
| DISCUSSIONE | pag. 88 |
| CONCLUSIONI | pag. 99 |
| BIBLIOGRAFIA | pag. 103 |

INTRODUZIONE

Acquacoltura

Il nostro Paese vanta una vocazione naturale per le attività legate al mare come la pesca, con la sua storia e le sue tradizioni.

Ma le risorse marine viventi devono essere gestite con attenzione, nell'ottica di assicurarne la disponibilità per le future generazioni, così da garantire uno sviluppo sostenibile per il settore. Il mare va protetto da un eccessivo sforzo di pesca, così come dagli impatti negativi che scaturiscono da altre attività umane, in modo che la sua ricchezza possa costituire un patrimonio accessibile a tutti.

L'acquacoltura, in quanto attività innovativa, è una forma produttiva in espansione il cui processo di modernizzazione coincide con un processo di crescita scientifica e tecnologica.

Uno degli obiettivi principali delle biotecnologie applicate alla acquacoltura è quello di migliorare e/o aumentare le produzioni negli allevamenti.

Attualmente l'allevamento e le tecnologie ad esso collegate sono più spesso rivolti alle specie d'acqua dolce, ma appare sempre più chiara l'insufficienza della pesca di approvvigionamento e la necessità di una maggiore applicazione delle biotecnologie nell'utilizzazione delle risorse marine. Per migliorare ed aumentare la produzione in acquacoltura, ci si indirizza principalmente verso lo studio e la ricerca finalizzata al miglioramento genetico delle specie ittiche pregiate. Nella ricerca applicativa in acquacoltura, l'obiettivo fondamentale è quello di ottenere stock che siano geneticamente superiori nell'incremento ponderale o nella velocità di

crescita o per una migliore conversione dell'alimento; un altro punto importante è quello di creare pesci più resistenti a condizioni ambientali difficili (quali ad es. le basse temperature) od, infine, indurre una maggiore resistenza alle malattie.

Un continuo processo di evoluzione ha portato oggi ad una acquacoltura che ha lo scopo di produrre per soddisfare la crescente domanda che la pesca oceanica non può coprire. Lo sviluppo di questo comparto è strettamente legato al potenziale ambientale e alla domanda di mercato.

Questo settore non può sostituire del tutto la pesca, ma sicuramente avrà un ruolo progressivamente più importante nell'assicurare al mercato prodotti ittici con una notevole diversificazione di specie (sono oltre 220 le specie allevate) e nella preservazione e ripopolamento delle acque interne ai fini della salvaguardia della biodiversità.

Individuare caratteristiche fenotipiche importanti per l'acquacoltura è uno degli aspetti necessari per garantire la qualità e quantità del prodotto allevato e, non per ultima, la rilevanza economica.

Quantitative Trait Locus: QTL

Il benessere del pesce è oggetto di crescente interesse in acquacoltura, grazie alla diffusa consapevolezza, sia tra i produttori che tra i consumatori, del fatto che l'animale mantenuto in buone condizioni costituisce poi un prodotto sicuro per il consumo umano. Fattori quali lo stress dovuto all'alta densità dei pesci e all'elevato livello di interazioni possono influenzare il benessere animale; in tali condizioni, un semplice monitoraggio della qualità dell'acqua può non essere sufficiente per valutare le condizioni di benessere degli animali. Anche il monitoraggio di parametri zootecnici (efficienza di conversione e tasso di crescita) od immunologici, non è ideale per valutare il benessere, dal momento che i dati monitorati saranno disponibili solo dopo che una parte rilevante del ciclo produttivo si è conclusa e non sempre possono essere sufficientemente completi. È pertanto necessario identificare ulteriori parametri che possano essere utilizzati per determinare o prevedere in tempo reale il benessere del pesce in condizioni di allevamento intensivo. Da qui l'esigenza di cercare dei marcatori molecolari tra quei geni come tratti quantitativi di rilevanza economica: se la conoscenza del patrimonio genetico dei pesci viene approfondita, il tasso riproduttivo delle popolazioni può essere migliorato per ottenere rese produttive più elevate negli allevamenti. Tali informazioni dovrebbero quindi permettere una crescita del pesce migliore e più veloce, la disponibilità di una miglior qualità di carne e, la messa a punto di un metodo efficace per riconoscere la resistenza (o suscettibilità) alle malattie infettive. Un **QTL** (dall'inglese *Quantitative Trait Locus*) è una regione di DNA associata ad un particolare carattere fenotipico di tipo quantitativo. Tale tratto è variabile in modo continuo, come l'altezza di una pianta, e non discreto, come invece il numero di foglie o l'aspetto

rugoso o liscio dei semi usato da Gregor Mendel nei suoi esperimenti.(1) .Il QTL è strettamente associato al gene che determina il tratto fenotipico in questione. Normalmente esso è determinato da più geni (un fenomeno detto epistasi). Di conseguenza più QTL, che possono trovarsi anche su diversi cromosomi, sono associati ad un singolo tratto. Il numero di QTL coinvolti in un tratto ,fornisce informazioni sull'architettura genetica del tratto; per esempio indica se l'altezza di una pianta è determinata da molti geni, l'effetto di ognuno dei quali è di portata limitata, oppure invece, pochi geni con un effetto più marcato. La variazione nell'espressione può essere dovuta alla combinazione di fattori genetici ed ambientali. I progressi della tecnica in campo della biologia molecolare, hanno permesso negli ultimi anni di mettere in luce nuovi polimorfismi all'interno di regioni codificanti e non-codificanti dei geni. I metodi per la rilevazione dei livelli elevati di variazione molecolare in popolazioni di piante e di animali, hanno permesso di sviluppare i programmi genetici dettagliati in una varietà di specie sul piano agricolo e di allevamento di animali. Tali programmi permettono il confronto di geni sui cromosomi fra le specie .Un uso tipico dei QTL è l'identificazione dei geni candidati (chiamati in questo caso QTG, ovvero *quantitative trait genes*) che determinano uno specifico tratto fenotipo. Il sequenziamento della regione di DNA identificata può quindi permettere di individuare i geni presenti e di confrontarli con geni di funzione già nota, per tentare una caratterizzazione funzionale e fornire un modello molecolare della determinazione del tratto fenotipico. Questo può essere in alcuni casi un polimorfismo di un singolo nucleotide (SNP) che viene chiamato in questo caso QTN, ovvero *quantitative trait nucleotide*. Riuscire a mappare il DNA di organismi acquatici per l'analisi di QTLs non è cosa facile perché ci sono pochi marcatori (Jackson et al, 1998)(Ozaki et al 2001). La difficoltà

di trovare una espressione fenotipica per geni di rilevanza economica, sta nel fatto che tali tratti hanno una distribuzione Gaussiana ed inoltre la maggior parte della popolazione di specie allevate sono ancora simili a popolazioni wild type (selvagge) .Da qui emerge la necessita di creare delle linee genetiche di organismi acquatici quanto più uniformi geneticamente; ciò nonostante, per il fatto che i pesci producono tantissime uova rispetto agli animali domestici ,garantisce la facilità dello studio dei QTLs .Marcatori genetici facenti parte di QTLs , il loro studio, soprattutto nelle prime fasi di sviluppo embrionale dei pesci, significa accelerare la selezione di specie negli allevamenti e apportare riduzioni di costi di allevamenti . Taura Sindrome virus (TSV) e White Spot Sindrome virus (WSSV), sono 2 virus che provocano patologie che colpiscono l'allevamento del crostaceo *Litopenaus vannamei*. Studi su marcatori genetici hanno permesso di rendere questi animali resistenti a queste patologie virali (Alcivar-Warren A. 2001) Un altro esempio di QTLs per la resistenza a patologie ad esempio, alle malattie di origine virali, e quindi alla resistenza a tali patologie sono stati riportati nella Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (Okamoto and Ozaki, 2000) andando a studiare l'infezione da necrosi pancreatica

Ferro: un nutriente essenziale

L'esigenza di cercare dei marcatori molecolari tra quei geni come tratti quantitativi di rilevanza economica, ha portato a soffermarci sul ferro e sul suo metabolismo in quanto è nota la sua importanza per la sintesi della emoglobina e quindi l'assorbimento dell'ossigeno disciolto nelle acque. Per il fatto che l'acqua è maggiormente densa dell'aria, i pesci spendono molta più energia per svolgere la respirazione che non gli animali che vivono nell'atmosfera. Inoltre, a causa delle basse disponibilità, anche piccoli cambiamenti del metabolismo di una comunità piscicola possono provocare repentini cambiamenti della quantità di ossigeno disciolto. I consumi di ossigeno variano in funzione della temperatura dell'acqua, della concentrazione di ossigeno disciolto presente, delle dimensioni del pesce, del livello di attività, del tempo trascorso dal momento dell'alimentazione. In caso di scarsità di ossigeno (concentrazione tra soglia ottimale e soglia critica inferiori), il meccanismo fisiologico che permette loro di adeguare le richieste alle scarse disponibilità è differente. Inizialmente i pesci cercano zone dove la concentrazione di ossigeno è superiore. Se questa tattica fallisce, essi diventano meno attivi per conservare energia e il restante ossigeno metabolico. In ogni caso quando i pesci ingurgitano acqua dalla superficie già si è instaurato il meccanismo fisiologico che prevede che parte della loro domanda metabolica sia supportata da fenomeni glicolitici o da cicli anaerobici. Come è noto, con la glicolisi si ha la produzione finale di acidi che vengono riversati nel sangue abbassandone il pH. Conseguenza di ciò è la diminuzione della capacità di trasporto di ossigeno da parte dell'emoglobina. I tessuti sono così ulteriormente sottoposti a scarsità di ossigeno, il che accelera il processo di decesso. Il ferro è il protagonista per

il trasporto dell'ossigeno nel sangue, per tenerlo depositato nei muscoli, per l'attività respiratoria cellulare, per la replicazione cellulare e per costruire la struttura di tessuti ed organi. In generale il ferro ha una particolare distribuzione cellulare: come ferro funzionale (nei globuli rossi sotto forma di emoglobina), negli enzimi ematici (citocromi); lo troviamo come ferro di trasporto (nel plasma sanguigno sotto forma di transferrina); infine è presente come ferro di deposito(nel fegato e milza). Dall'altra parte il ferro, se in eccesso, è tossico e può essere mortale. Qualsiasi essere vivente, dal batterio all'uomo ha così sviluppato sistemi più o meno raffinati per catturare il ferro dal mondo esterno e utilizzarlo e ,dall'altra parte, per trasportarlo e tenerlo depositato in una forma non tossica. Uno dei suoi ruoli principali è quello di cofattore per enzimi: grazie alla sua conformazione atomica,è predisposto facilmente a donare e ad accettare elettroni passando da uno stadio ferroso (Fe^{2+}) ad uno stadio ferrico (Fe^{3+}) (2) forma libera reagisce con H_2O_2 in quella reazione chiamata Fenton (2)(3). I prodotti di questa reazione includono ossigeno sotto forma di radicale libero che causa danno cellulare tra cui: distruzione ossidativi di proteine, lipidi e DNA. Per proteggersi da tali danni cellulari, gli animali trasportano il ferro attraverso la glicoproteina *transferrina* prodotta dal fegato (4)(5).La *transferrina* serve come meccanismo di trasporto per il ferro da siti di assorbimento e di deposito nei tessuti. Le cellule incorporano il ferro legato alla transferrina,mediante *apostraferrina* che cattura il ferro (holotransferrina) e grazie al recettore della transferrina (TfR) il Fe viene incorporato all'interno della cellula mediante endocitosi (ciclo della transferrina) (6)(7) (fig 1)

Nel primo step di questo ciclo,la molecola della transferrina (apo-holo transferrina) legando il recettore,crea una vescicola endocitica nel sito di

legame. Questo comporta un abbassamento di pH per mezzo della pompa Na^+/H^+ ATPase. Questo pH 5.5 causa cambiamento conformazionale della proteina per cui il Fe si stacca dalla transferrina formando *apotransferrina* e Fe^{2+} . Questo ferro libero è trasportato dal *divalent metal transporter* (*DMT1*) dall'endosoma al cytosol. Il ciclo della transferrina è completato quando l'endosoma ritorna e si fonde con la membrana plasmatica.

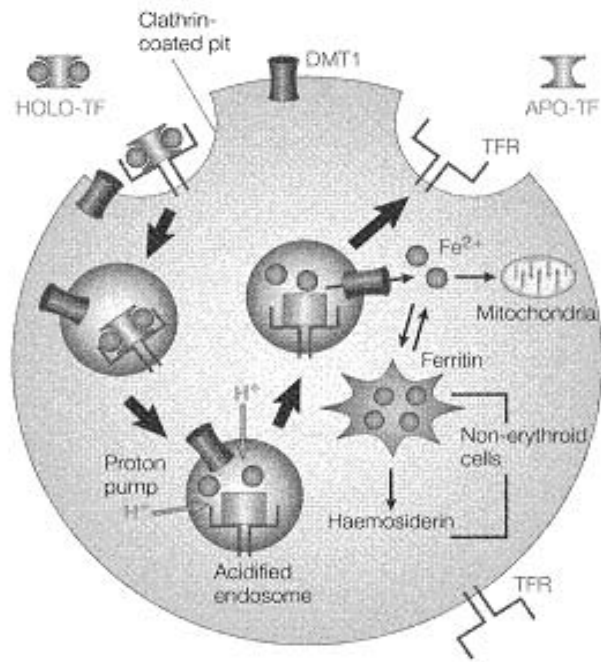


Fig 1 : ciclo della transferrina

L'abilità nel trasferire ferro dalla madre all'embrione è essenziale per lo sviluppo embrionale (fig2) Gli animali vivipari, come mammiferi, trasportano il ferro attraverso il sacco vitellino e la placenta(14). (fig 2a) Il sacco vitellino e più tardi la placenta, formano interfaccia tra la circolazione materna e quella dell'embrione. Nella placenta umana la circolazione materna e dell'embrione sono separate da tessuti di origine embrionali derivanti dal sinciziotrofoblasto. La transferrina lega il ferro dalla superficie apicale del sinciziotrofoblasto e lo trasporta nel torrente sanguigno dell'embrione.

In maniera differente negli embrioni di pollo, il ferro nel vitello è trasportato nel sangue in circolo.(15) Altri ovipari come le rane e i pesci depositano il ferro nel vitello delle uova per successiva utilizzazione durante lo sviluppo embrionale.(16) (17)

Per esempio nello zebrafish derivati dal vitello materno trasportano il ferro, attraverso la membrana dello yolk syncytial layer, nel torrente circolatorio dell'embrione. (fig 2b)

La maggior parte del ferro che le cellule incorporano serve alla emoglobina. Nel muscolo il ferro è incorporato nella *mioglobina*, nel fegato e nel reticolo endoplasmatico è incorporato nella *ferritina* e infine nel siero, il ferro, è legato alla *transferrina*.(32)(6)

I mammiferi, perché non hanno la capacità di eliminare ferro, hanno sviluppato una alta regolazione seguendo una rigida via: l'assorbimento per via intestinale può essere regolato da una dieta alimentare, dopo ingestione l'intestino blocca l'ingresso di altro ferro grazie al "blocco della mucosa" (24) Si pensa che probabilmente questo blocco regoli o è regolato da fattori trascrizionale, oppure dal legame di IRE al 3' UTR di DMT1 o da entrambe le vie.

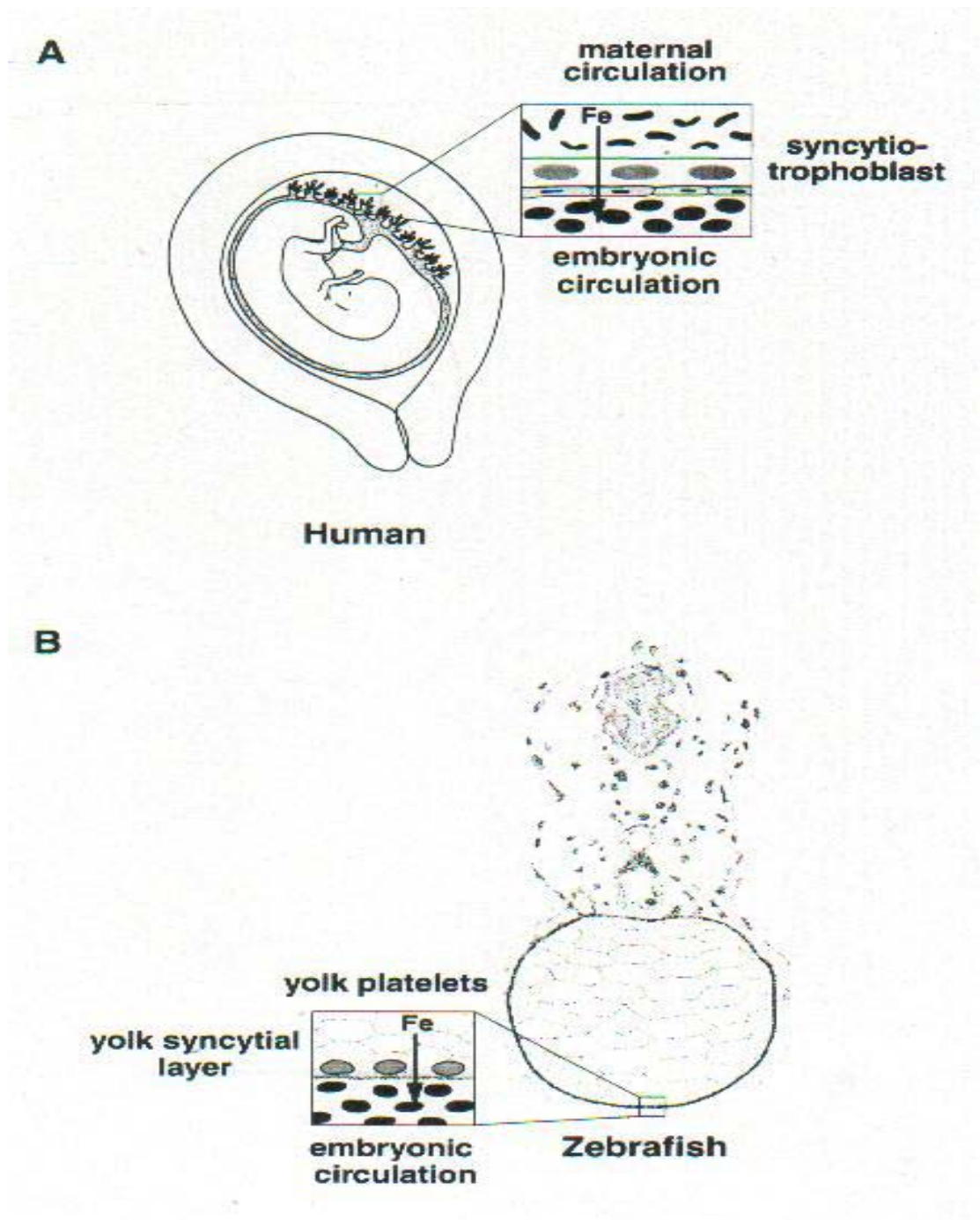


Fig 2a / 2b: trasporto del ferro tra madre ed embrione regolazione cellulare nel metabolismo del Ferro : IREs

La sintesi delle proteine chiave per il metabolismo del ferro è regolata dai livelli del ferro nella cellula. *Iron response elements (IREs)* sono sequenze nucleotidiche cis-regolative identificate nella zona 3' UTR (regione non tradotta) del recettore della *transferrina (TfR)*(62)(18) e *DMT1* (52)(19) e nella zona 5' UTR della *ferritina* (63)(20) e nell'enzima *ALAS2* per la biosintesi di Heme .

La sequenza nucleotidica dell' IREs forma un anello sul mRNA dove si legano due *iron regulatory proteins (IRP)* (21) (22) .Gli *IRP* si legano agli IRE per preservare il messaggero dagli attacchi di endonucleasi.

(Fig 3)Basse concentrazioni di ferro , favorisce il legame della proteina IRP1al IRE.IRP1 ha attività aconitasica (cluster con 3Fe -4S); quando al cluster si lega Fe,(cluster con 4Fe-4S) IRP1 non può legare IRE e quindi si degrada.

IRP2 è una proteina omologa a IRP1 ,e dipende dalla concentrazione di ferro all'interno della cellula. Ha un dominio di degradazione del ferro (23)

Tale sistema cellulare regola la richiesta di attivazione di *transferrina* e/o *DMT1*, e provvede al deposito del ferro grazie alla *Ferritina*.

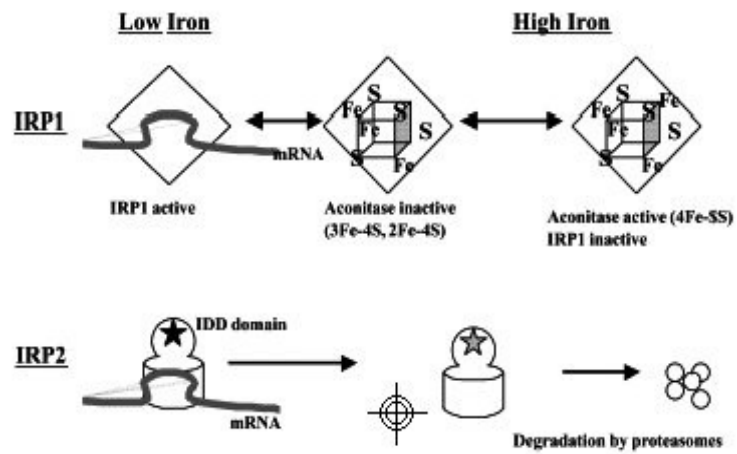


Fig 3: regolazione degli IRP 1 e IRP2

Tra le molteplici funzioni che il ferro ha, quello di maggior interesse, è nella sintesi della emoglobina e quindi la genesi e il differenziamento della linea ematopoietica riguardante gli eritrociti. In generale nei vertebrati gli eritrociti si generano da cellule provenienti dal mesoderma ventrale.

originano da un gruppo di cellule totipotenti chiamate *cellule staminali ematopoietiche*. Attraverso processi di differenziamento e di proliferazione, queste generano le linee cellulari mieloide, linfoide e eritroide.(8)

La linea mieloide (neutrofili, monociti e macrofagi) e la linea linfoide (linfociti B e T) sono essenziali per la difesa dell'organismo dall'attacco di agenti patogeni come virus e batteri.

La linea eritroide produce un singolo tipo di cellule, gli eritrociti. Quest'ultimi producono emoglobina, una proteina capace di legare l'ossigeno e anidride carbonica (9)

Gli eritrociti si originano da cellule progenitrici detti Pro-eritroblasti (primi precursori istologicamente identificati)(10)(11)(12), esprimono dei messaggeri(mRNA)che codificano per proteine essenziali per la produzione di emoglobina, come la catena α -globina e la catena β -globina, enzimi per la sintesi di *heme*, e proteine che comprendono il ciclo della *transferrina* (il maggior pathway di legame del ferro nella linea eritroide.) Appena la *globina* è sintetizzata,il ferro legato alla *transferrina*, è incorporato alla *protoporfirina* per la sintesi dell'*heme*

La molecola completa di *heme* è poi incorporata nelle due catene della *globina* (α e β) per formare l'*emoglobina* .(fig 4)

Nella fase finale di formazione degli eritrociti, in mammiferi,le cellule eliminano il nucleo, formando gli eritrociti maturi (12) con la tipica forma biconcava. Il tempo di sopravvivenza degli eritrociti nel sangue è di circa 100-120 giorni.

.Nello zebrafish, in particolare, è emerso che gli eritrociti si originano da cellule localizzate nel margine ventrale allo stadio di gastrula (Kimmel et al 1990; Wang, 1996) a 24 hpf , quando il cuore è ben formato parte degli eritrociti maturi iniziano a circolare (Weinstein et al 1996)

Solo dopo due giorni dalla fecondazione gli eritrociti hanno completato il loro differenziamento con una emoglobina in grado di trasportare ossigeno.

Le due distinte proteine che compongono la emoglobina , sono codificate da i due geni α e β globina. Nei mammiferi differenti isoforme di α e β globina sono espresse durante gli stadi di sviluppo in risposta alle diverse necessità di ossigeno nelle varie fasi embrionali fino allo stadio di adulto.

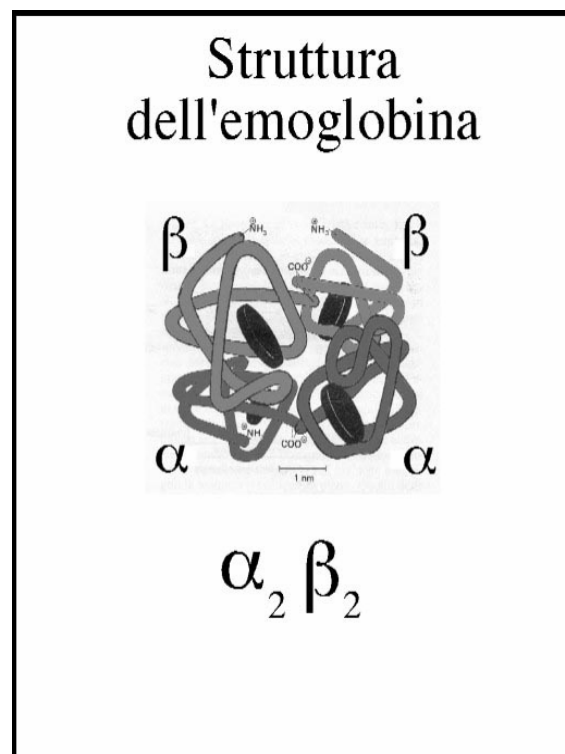


Fig 4 :Struttura dell'emoglobina

Le due distinte proteine che compongono la emoglobina , sono codificate da i due geni α e β globina.. Nei mammiferi differenti isoforme di α e β globina sono espresse durante gli stadi di sviluppo in risposta alle diverse necessita di ossigeno nelle varie fasi embrionali fino allo stadio di adulto.

Un componente essenziale dell'emoglobina è la molecola della porfirina che si combina con il ferro per dare *eme*.

Nella cascata enzimatica,l'anello della porfirina è sintetizzata dal succinil CoA e dalla glicina .(13)

Nel primo step nella biosintesi di *eme*,la conversione del succinil CoA e glicina in acido aminolevulinico (ALA) avviene nel mitocondrio ad opera una specifica forma di aminolevulinic acid synthetase (ALASE or ALAS 2). Il prodotto di questo step ,ALA, è trasportato nel citosol dove è convertito in coproporfirinogeno 3 .Quest'ultimo è trasportato indietro nuovamentene nel mitocondrio dove dopo due step enzimatici,l'enzima ferrochetalase aggiunge un atomo di ferro alla protoporfirina , formando *eme*. (fig 5)

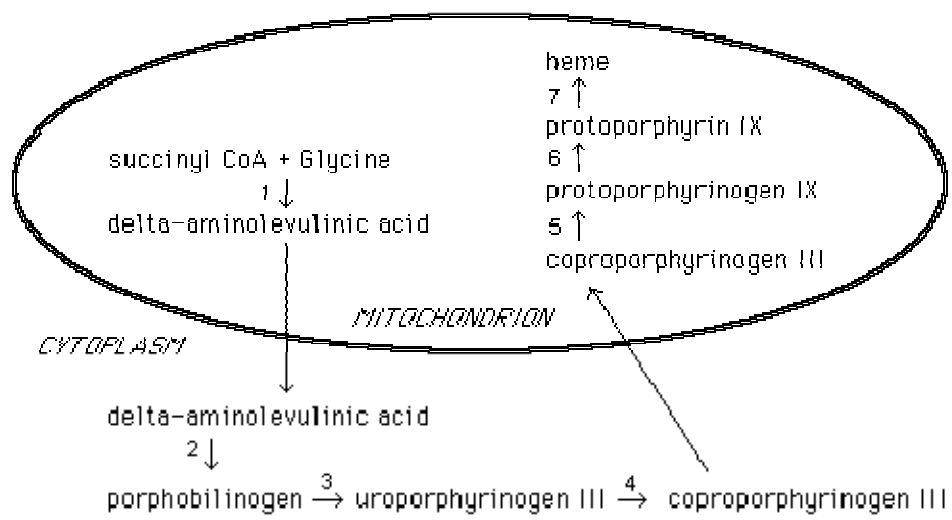


Fig 5 : Biosintesi di eme dal citoplasma al mitocondrio

***Danio rerio* -zebrafish: sistema modello genetico e di sviluppo**

Volendoci occupare dell'aspetto molecolare dell'ematopoiesi che comprende il trasporo del ferro e quindi la sintesi di eme in pesci commercialmente rilevanti per l'acquacoltura, ed essendo questo settore di ricerca inesplorato, ci siamo avvalsi dell'utilizzo di un modello biologico sperimentale quale il *Danio rerio* (Zebrafish).

Il pesce zebra o *Danio rerio*, noto anche col nome inglese Zebrafish, sta assumendo un ruolo sempre più predominante in ambito scientifico, non solo nella ricerca di base, anche negli studi comportamentali, nella patogenesi di alcuni batteri (25)(26), nelle neuro scienze (27) (28), nella ricerca farmaceutica e in particolare nello studio di malattie ereditarie e congenite (29) (30).

Questo piccolo pesce (2-3 Cm di lunghezza in età adulta) (Foto 1) ha fatto la sua entrata nella storia della biologia grazie alla trasparenza dell'embrione, una grande capacità proliferativa, la fecondazione esterna ed un breve intervallo fra una generazione e la successiva. Oltre quanto menzionato, la possibilità di indurre mutazioni puntiformi sui singoli geni, isolare mutanti e l'uso di tecnologie di biologia cellulare quali il trapianto di cellule e l'eliminazione selettiva di attività genetiche specifiche, ha permesso il suo utilizzo in uno spettro scientifico sempre più ampio in via di completamento, grazie al progetto genoma umano e al sequenziamento dell'intero genoma di zebrafish da parte del Sanger centre.

Lo zebrafish è stato utilizzato in diversi ambienti della biologia che vanno dalla biochimica alla biologia comportamentale.



Foto 1: *Brachidanio rerio*

Lo sviluppo embrionale dello zebrafish avviene ad una temperatura fra i 26 e i 28 gradi centigradi. In realtà lo sviluppo avviene normalmente in un ambito di temperature più ampio che va dai 21 ai 32 gradi centigradi. Questo garantisce la possibilità di studi eterocronici durante lo sviluppo utilizzando tecniche di trapianto cellulare.

La prima divisione cellulare avviene dopo $\frac{3}{4}$ d'ora dalla fecondazione e nel giro di 24 ore il pesce mostra caratteristiche morfologiche ben distinte.(Fig 6-7) (31)La semplice osservazione al microscopio permette di riconoscere gli occhi, gli orbitali, gli otoliti, i somiti, i dotti pronefrici, i precursori delle cellule del sangue, un sistema vascolare, dei placidi olfattivi e l'epifisi.

Inoltre utilizzando anticorpi o marker genetici è possibile evidenziare un sistema nervoso ben organizzato e definito seppur più semplice rispetto a quello dei mammiferi.

Nel giro di 48 hpf (ore dopo fecondazione)(32) (Fig 8) si potrà osservare una pompa cardiaca e la dinamica delle cellule del sangue. Utilizzando marcatori molecolari opportuni inizieranno a distinguere diversi tipi di neuroni ed un apparato gastrointestinale in formazione che potrà essere osservato morfologicamente al quinto giorno.(Fig 9)

Grazie alla rapidità di sviluppo dello zebrafish ci permette facilmente la manipolazione automatizzata, garantendo così il trattamento e l'analisi di molti embrioni simultaneamente. Inoltre l'allevamento dello zebrafish è 1/100 a 1/1000 economicamente più vantaggioso rispetto al topo. Non solo i costi di mantenimento spiegano la sua forte crescita nell'utilizzo a scopo di ricerca, ma anche considerazioni di natura economica sulla quantità di prodotto utilizzato per effettuare analisi.

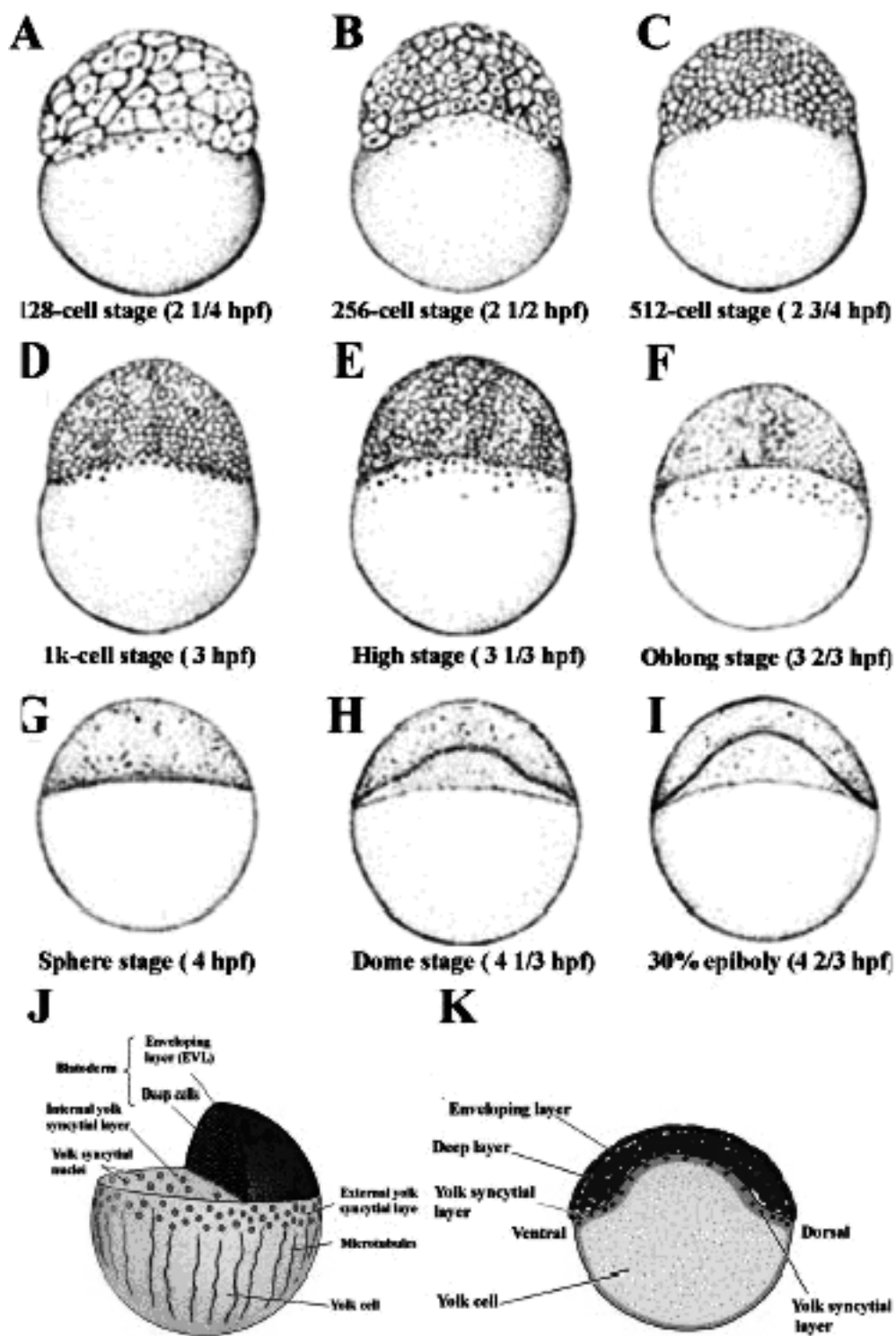


Fig 6: Primi stadi di sviluppo embrionale di Zebrafish (Gilbert, 2003; Kimmel et al 1995)

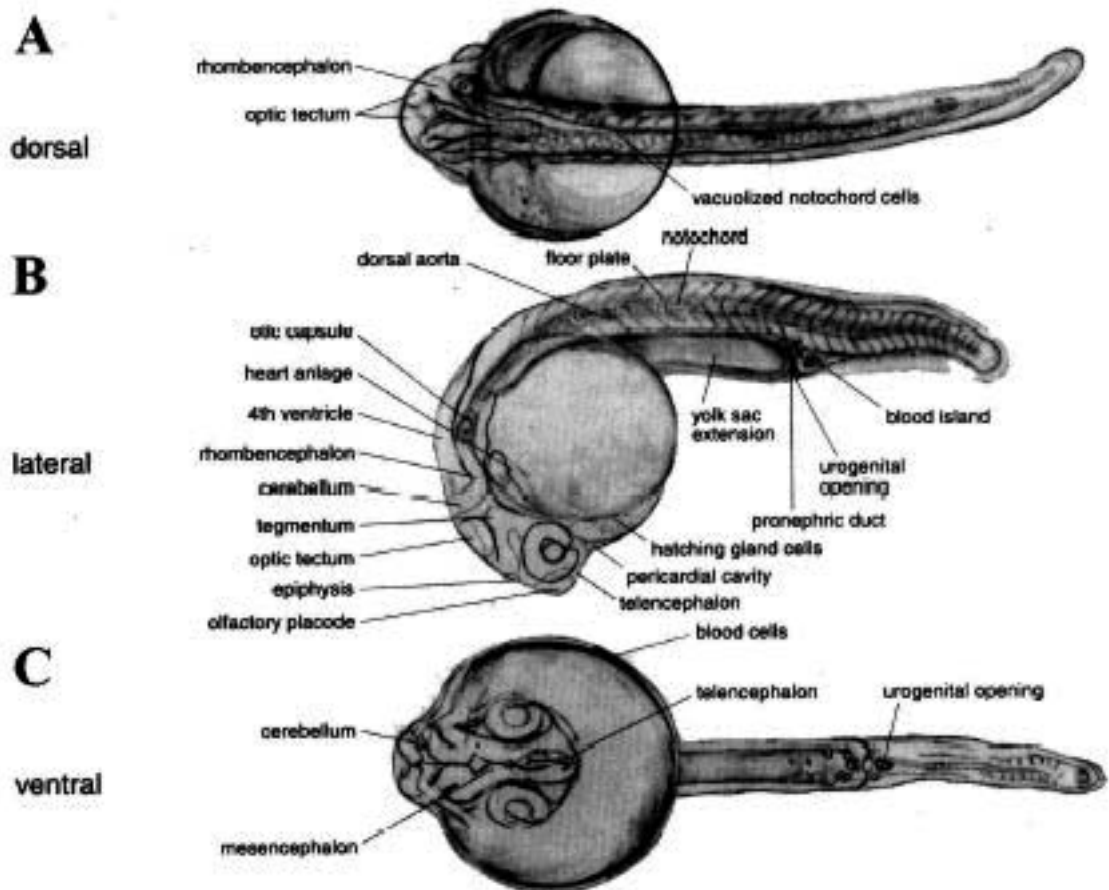


Fig 7: sviluppo embrionale di Zebrafish a 24 hpf (Gilbert, 2003; Kimmel et al 1995)

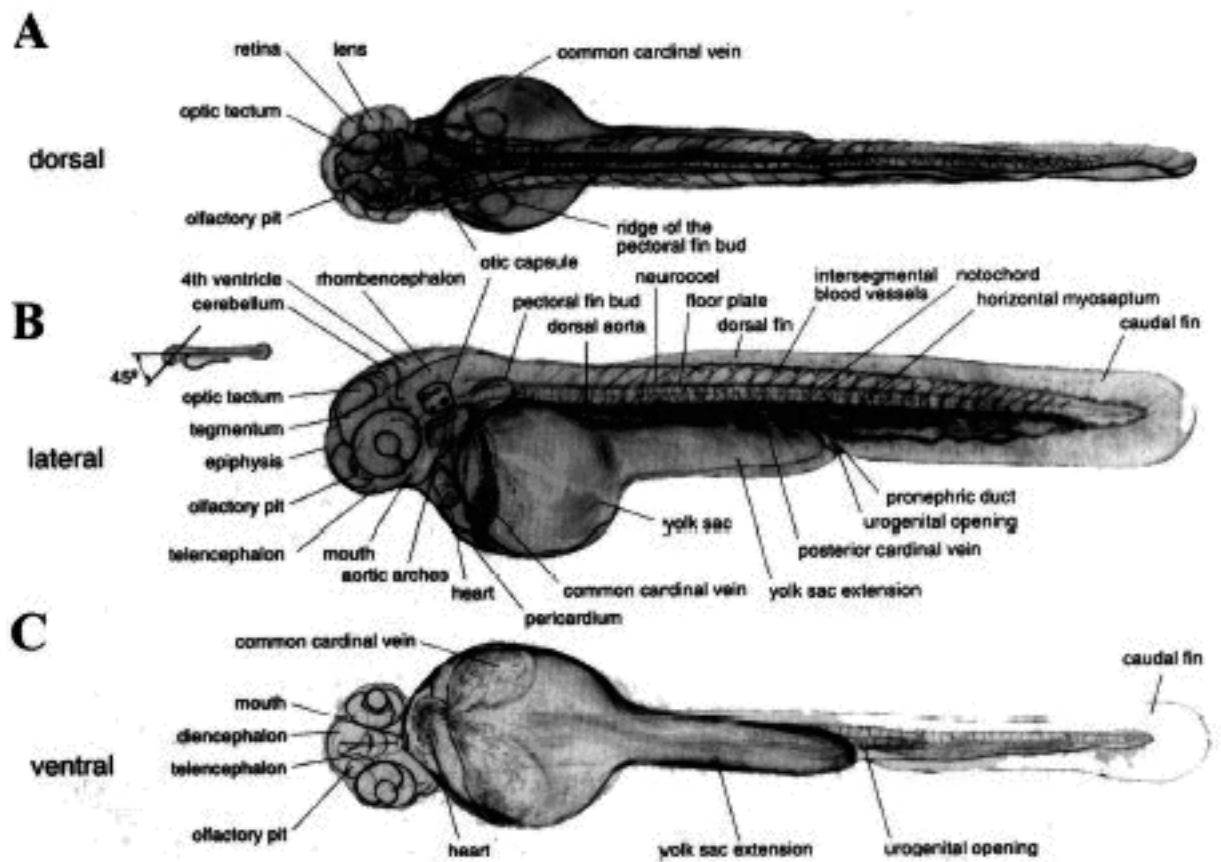


Fig 8: sviluppo embrionale di Zebrafish a 48hpf hpf (Gilbert, 2003; Kimmel et al 1995)

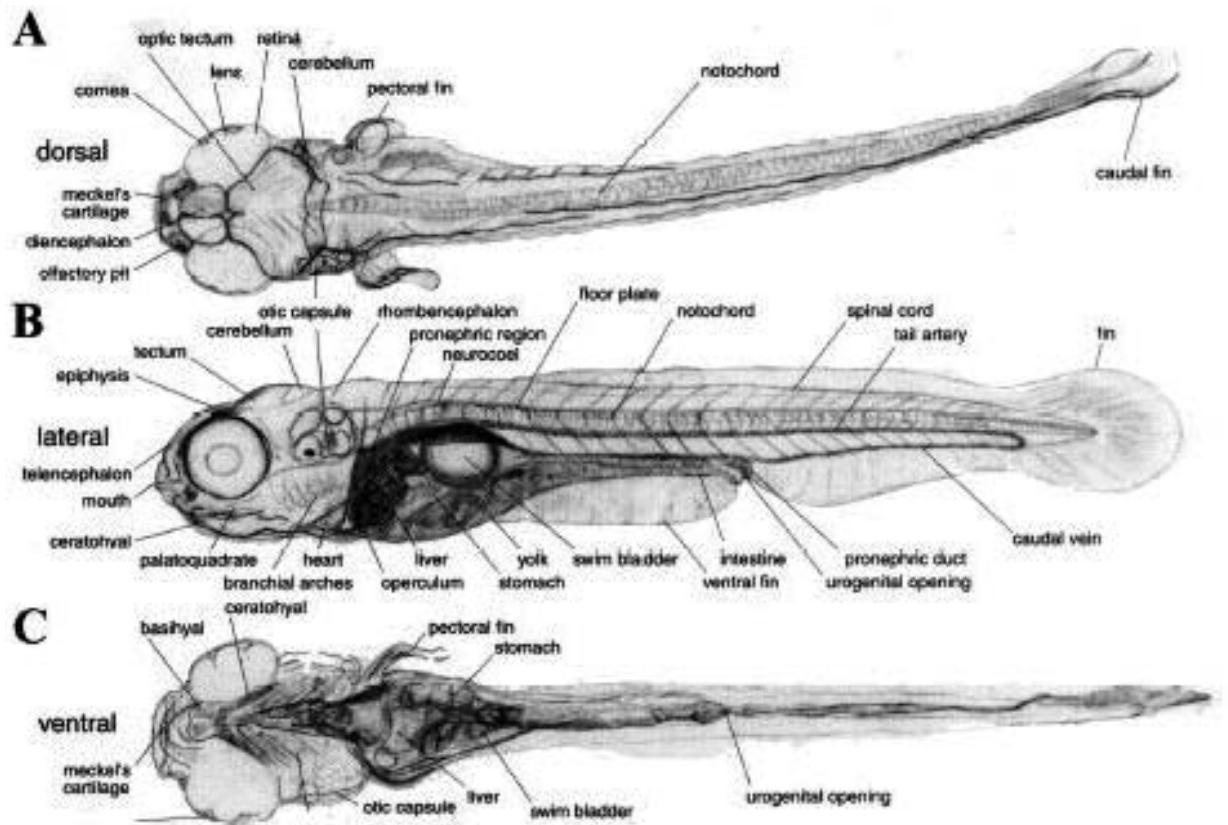


Fig 9: sviluppo embrionale di zebrafish a 5 giorni (Gilbert, 2003; Kimmel et al 1995)

Ad oggi, due grandi screening sono stati effettuati in zebrafish allo scopo di isolare mutanti. Uno screening chimico utilizzando *l'etil nitroso urea* (ENU) come agente mutagenizzante (32) ed uno screening per inserzione (33). Il risultato di questi due screening è stata una collezione di migliaia di mutanti di zebrafish.

Recenti sviluppi tecnici usati per lo studio dello sviluppo hanno aperto nuove strade nell'investigazione delle diverse funzioni geniche. In particolare è risultata su di grande importanza la possibilità di effettuare “knock-down”, ovvero ablazioni geniche funzionali utilizzando fosforodiammidato morfolino oligonucleotide (morfolino), in grado di bloccare in maniera sequenza specifica la traduzione degli mRNA (34)

La possibilità di utilizzare mutanti chimicamente indotti e di ablazioni funzionali ha portato lo zebrafish ad essere utilizzato come modello per diverse malattie. Tale sistema è utilizzato anche per modellizzare il sistema ematopoietico, cardiovascolare (35), visivo (36) ed i disordini renali (37).

Oltretutto è usato come modello di studio sull'angiogenesi (38) e per la sordità genetica umana (39); ultimamente sta risultando anche un modello emergente per lo studio delle malattie neuro degenerative e neuro muscolari come l' Alzheimer e la distrofia muscolare Duchenne e diverse miopatie (30).

Il sistema modello *Danio rerio* si presenta perfettamente come strumento genetico per affrontare lo studio di meccanismi molecolari (quale ad esempio il metabolismo del Fe) che interessano in particolare l'acquacoltura, grazie al connubio tra vaste conoscenze di genetica e genomica da un lato e la disponibilità di numerosi approcci di genetica dello sviluppo e di post-genomica dall'altro.

SCOPO DELLA RICERCA

Il valore applicativo dei nostri studi risiede nell'individuazione di regioni genetiche associate a potenziali markers di interesse per l'acquacoltura.. In questo lavoro abbiamo intrapreso lo studio dei processi genetici responsabili del metabolismo del ferro durante lo sviluppo embrionale.

La scelta del metabolismo di questo ione metallo, importante per il ruolo anti-ossidativo in diversi processi biologici, ,e non solo, si ricollega alle iniziali osservazioni del gruppo della Dott. ssa Spagnuolo, presso la Stazione Zoologica di Napoli su l'ascidia *Ciona intestinalis*, che suggeriscono un nesso causale tra l'attività del gene *heme binding protein (hbp)* e ipotetica origine delle germ cells. Ulteriori spunti sono stati ottenuti dal lavoro del gruppo del prof. Leonard Zon presso la Harvard Medical School in Boston, riguardante il meccanismo e la regolazione del ferro in zebrafish per lo studio delle anemie. Il sistema modello *Danio rerio*, lo zebrafish, si presta perfettamente come strumento genetico per affrontare questi interrogativi nei vertebrati inferiori. Il nostro scopo è stato quello di cercare un gene di interesse in acquacoltura e candidarlo per un ipotetico QTL .

Il nostro interesse si è indirizzato verso il gene *Heme Binding Protein* facente parte di quella famiglia di geni chiamati ***Soul***. Informazioni su questa famiglia di geni sono ancora sconosciute; primi studi sono stati effettuati dal gruppo Taketani (52) che ha individuato un dominio idrofobico nella sequenza amminoacidica della proteina hbp2 in colture

cellulari di topo che sembra essere simile al dominio *soul* nel pollo studiato dal gruppo Zylka.

Il nostro lavoro è consistito nella individuazione di due ortologi di *heme binding protein* chiamati *hbp2a* e *hbp2b* in zebrafish e confrontarli con geni *soul* per individuare eventuale appartenenza alla suddetta proteina; Proseguendo con la clonazione in in vettori di espressione, eseguendo un'analisi delle caratteristiche strutturali e il monitoraggio degli spazi e tempi dell'attività trascrizionale mediante ibridazione *in situ* ed RT-PCR; altresì, con iniezione in ovociti di zebrafish di oligonucleotidi modificati (morfolino) in grado di bloccare specificamente la traduzione degli mRNA degli ortologi *soul/hbp* (perdita di funzione). Ancora individuare eventuali interazioni regolative e funzionali tra i geni *soul/hbp* oggetto di questo studio, ed altri geni eritrogenici,

In generale possiamo affermare che la conoscenza della struttura del genoma e quindi della funzione di ogni singola proteina, enzima, recettore che deriva dalla sua decifrazione, permetterà di intervenire su di esse, al fine di migliorare la qualità delle specie allevate per modificarne le proprietà a nostro beneficio per correggerne i difetti. L'impiego di tecniche di biochimica e di biologia molecolare ci permetterà di analizzare questi marcatori genetici oggetto di studio, con applicazioni tipo: individuazione della tassonomia molecolare e riconoscimento di specie, ricostruzioni delle relazioni filogenetiche, analisi della struttura genetica dello stock, valutazione della variabilità genetica, valutazione del successo riproduttivo di riproduttori di specie ittiche in cattività e la valutazione dell'impatto genetico sulle popolazioni naturali di pesci di allevamento scappati o rilasciati.

La relazione che intercorre tra il metabolismo del ferro e l'acquacoltura è un territorio ancora inesplorato, pur essendo palese la sua importanza in campo della gnomica acquatica: lavorare sui geni che regolano il trasporto dell'ossigeno nel sangue e quindi nei muscoli, permette una regolazione del metabolismo senza fare uso di farmaci, (basti pensare all'uso illegale di anabolizzanti in zootecnia per l'aumento della massa muscolare) In acquacoltura migliorare parametri come la composizione muscolare e l'accumulo di grasso, avendo la maggior parte dei pesci, massa corporea costituita prevalentemente da muscoli, è essenziale per garantire la qualità del prodotto allevato. Il legame tra muscoli e ossigeno è noto: La distribuzione di ossigeno avviene tramite i globuli rossi e i pigmenti in essi contenuti (l'emoglobina), la quantità di ossigeno trasportata dal sangue dipende dal numero di globuli rossi che determina la proporzione di ferro contenuta nel sangue.

È ovvio che volendoci occupare di questo aspetto molecolare quale appunto la ematopoiesi che comprende il trasporto del ferro e quindi la sintesi di heme in pesci commercialmente rilevanti per l'acquacoltura, ed essendo questo settore

di ricerca inesplorato, ci siamo avvalsi dell'utilizzo di un modello biologico sperimentale quale il *Danio rerio* (Zebrafish).

Studi sullo sviluppo delle cellule del sangue e sul programma di sviluppo hanno dimostrato che tale piano è simile a quello dei mammiferi (40-41). I geni essenziali per il normale sviluppo del sangue clonati da zebrafish e blastati con quelli di mammifero, hanno dimostrato che sono altamente conservati. (42-43).

MATERIALI E METODI

N.B La composizione di ogni soluzione è riportata nelle tabelle

CLONAGGIO di *soula* in **pBluescript KS II-** vector

Il clone IMAGE CODICE, acquistato presso la società RZPD (Berlino), è stato inizialmente sequenziato

Un cDNA contenente una sequenza annotata come gene *hbp2* ci è stato fornito dalla RZPD *Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH* in Berlino. Il frammento di cDNA era clonato nel vettore **pME18S-FL3**, (Fig 11). Innanzitutto onde verificare l'identità del clone abbiamo proceduto al sequenziamento. Il BLAST della sequenza ha confermato la presenza, all'interno del clone, dell'intera regione codificante di un gene appartenente alla famiglia *hbp2* è stato sub clonato nel vettore **pBluescript KS II-** con l'enzima di restrizione EcoRV (fig 12) e successivamente ligato al vettore. La miscela di reazione è così composta:

| | |
|---|--------|
| Tampone Ligasi 10 x (Tab.5) | 1 µl |
| DTT 100 mM | 0.5 µl |
| ATP 10 mM | 0.5 µl |
| vettore pBluescript KS II+ (50 ng / ml) | 1 µl |
| DNA | 2 µl |
| T4 DNA ligasi | 0.5 µl |

H₂O sterile

4.5 µl

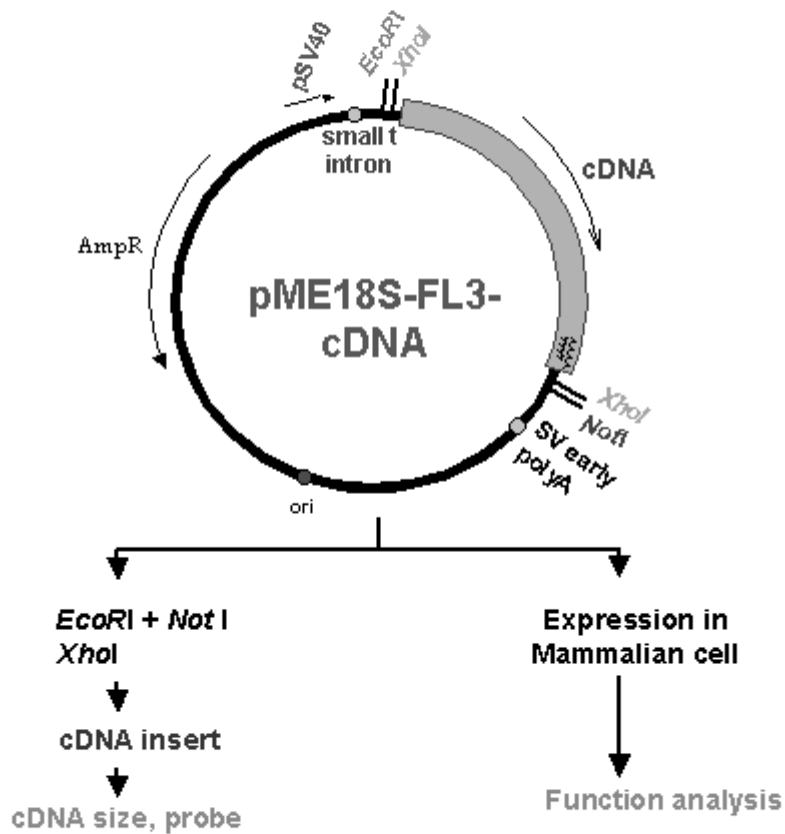
La miscela è stata incubata a 14°C per la notte. Al termine della reazione la ligasi T4 è stata inattivata a 65°C per 15 minuti.

5' region :

.....TGAATTCCTCGAGCACTGTTGGCCTACTGG.....
Vector ← | → Linker ← | → cDNA

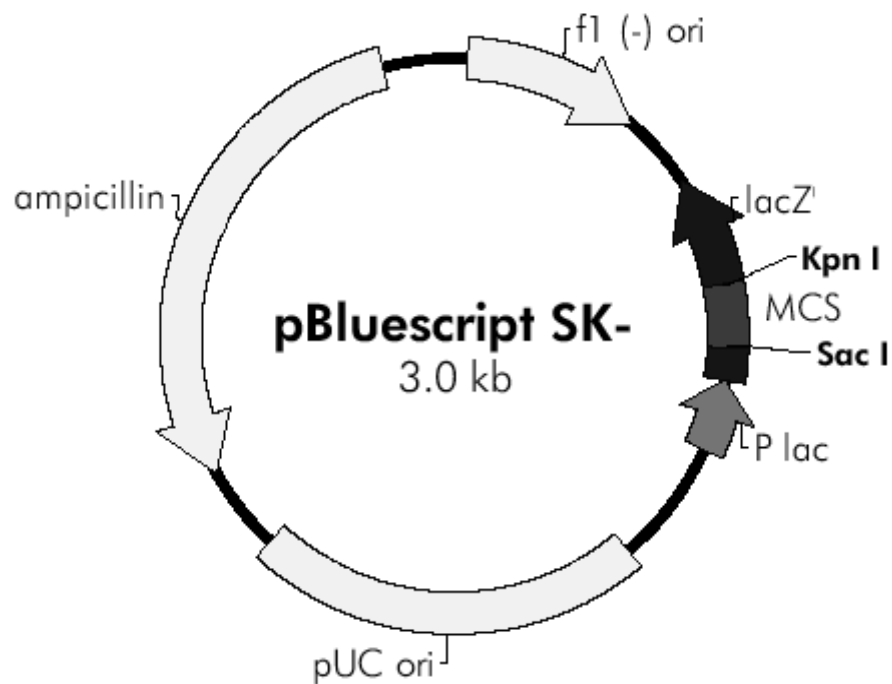
3' region :

.....AAAAGGCCACATGTGCTCGAGCTGC.....
cDNA ← | → Linker ← | → Vector



Multi-functional pME18S-FL3 vector

Fig 10: Vettore pME18s-FL3-cDNA



```

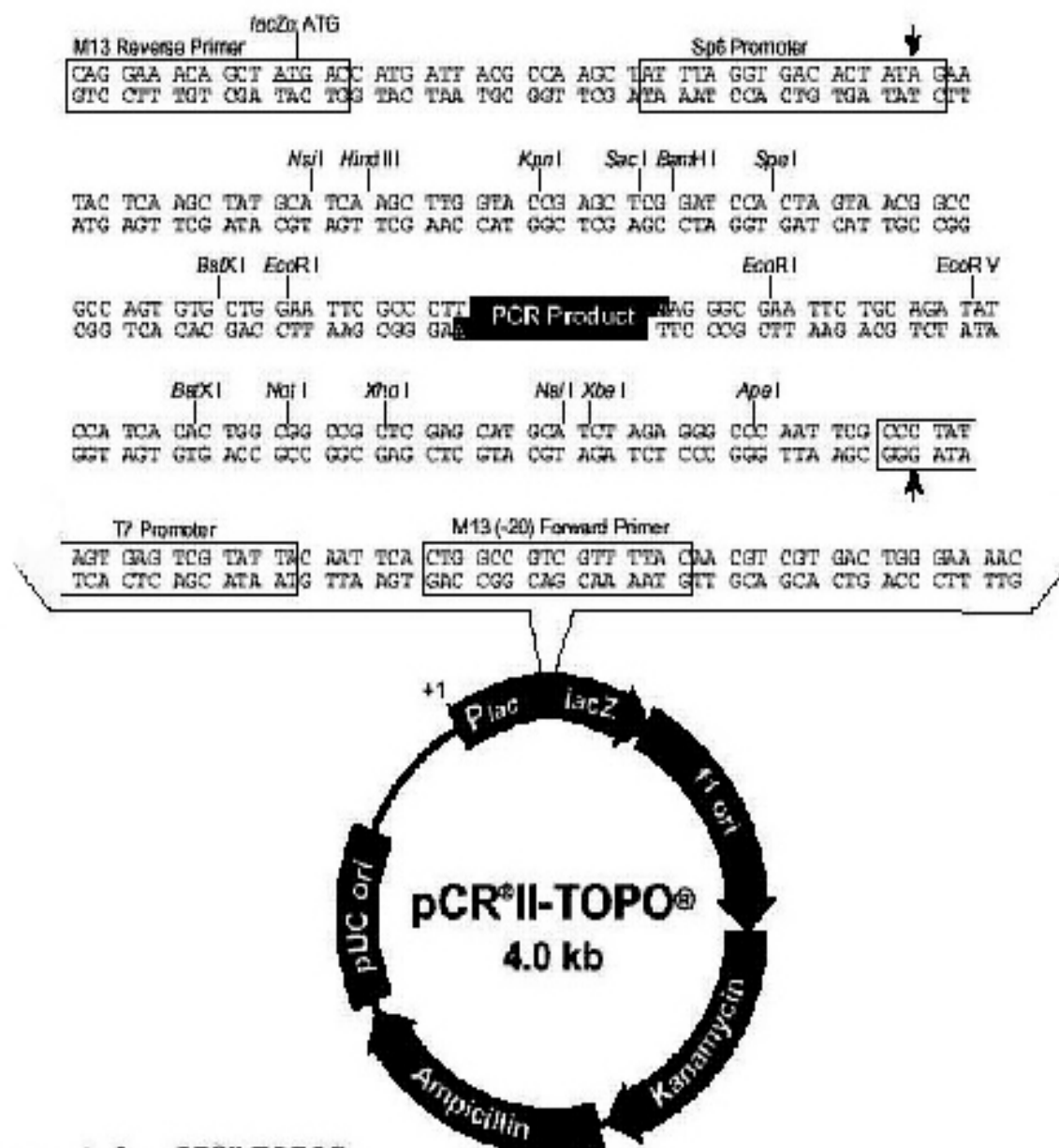
GTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGC
      T7 promoter →
GTAATACGACTCACTATAGGGCGAA
      KpnI                      XhoI
TTGGGTACCGGGCCCCCCCCTCGAGG
      Sall          ClaI   HindIII   EcoRV
TCGACGGTATCGATAAGCTTGATAT
      EcoRI   PstI   SmaI   BamHI
CGAATTCTGTCAGCCCGGGGGATCC
      SpeI   XbaI   NotI   SacII
ACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCG
      SacI
CGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCT
← T3 promoter
TTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTT
GGCGTAATCATGGTCATAGCTGTT
  
```

Fig 11 : Vettore pBluescript SK-

CLONAGGIO di *soulA* pCR® II-TOPO®

Il gene *hbp2b* è stato amplificato e clonato nel vettore pCR® II-TOPO® (fig 13) direttamente da prodotto PCR seguendo il protocollo ad una temperatura di 37°C per 30':

| | |
|------------------|------------------------------|
| TOPO Cloning | 1 µl |
| Prodotto PCR | 2 µl |
| Soluzione salina | 1 µl |
| H2O | fino a volume finale di 5 µl |



Comments for pCR[®]II-TOPO[®] 3973 nucleotides

LacZα gene: bases 1-589

M13 Reverse priming site: bases 205-221

Sp6 promoter: bases 239-256

Multiple Cloning Site: bases 269-383

T7 promoter: bases 406-425

M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448

f1 origin: bases 590-1027

Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155

Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033

pUC origin: bases 3178-3851

Trasformazione di DNA plasmidico in cellule batteriche con elettroporazione

Questa tecnica permette di inserire costrutti di DNA in cellule batteriche che sono sottoposte ad uno shock elettrico il quale provoca l'apertura di pori sulla membrana plasmatica. Per le trasformazioni sono stati usati circa 10 µl di reazioni di ligasi, precedentemente tenute a 65°C per 10 min, raffreddate in ghiaccio e microdializzate contro dH₂O sterile per un'ora. Si è utilizzata una elettrocuvetta Bio-Rad Gene Pulser contenente il DNA plasmidico e le cellule batteriche del ceppo *Escherichia coli* "TOP 10" competenti per elettroporazione, posizionata nell'apposito alloggio dell'elettroporatore Bio-Rad Gene Pulser.

Dopo l'impulso elettrico a voltaggio costante di 1.7 V, le cellule sono state riprese in 1 ml di LB, poste a 37°C per 1 ora, e aliquote dai 10 ai 50 µl sono stati piastrati su LB solido con l'antibiotico per il quale il plasmide è resistente.

Minipreparazione di DNA plasmidico

Per poter isolare il DNA plasmidico dalle cellule batteriche è stato utilizzato il Kit QIAprep Spin Miniprep della QUIAGEN ed il relativo protocollo.

Dai 5 ml di ciascuna coltura batterica sono state prelevate aliquote di 500 µl, cui è stato aggiunto un eguale volume di una soluzione sterile di glicerolo al 40%; dopo accurata agitazione su vortex, le aliquote sono state conservate a -20°C, al fine di ottenere uno stock di batteri trasformati. Il restante volume è stato centrifugato a 3000 rpm per 10 minuti in centrifuga Beckman GS-6R con rotore GH 3.7, è stato eliminato il sopranatante ed il precipitato batterico è stato risospeso in 250 µl di tampone P1 freddo (4°C). Sono stati aggiunti 250 µl di tampone P2,

dopo aver mescolato delicatamente per inversione, sono stati aggiunti 350 µl di tampone N3 e i campioni sono stati nuovamente mescolati per inversione. Dopo centrifugazione di 10 minuti a 14000 rpm in microcentrifuga Eppendorf, il supernatante è stato applicato alle colonnine QIAprep e centrifugato alla velocità di 4000 rpm per 1 minuto, a questo punto il DNA si lega alla colonnina.

Successivamente, è stato effettuato un primo lavaggio della colonnina con 500 µl di tampone PB e una centrifugazione a 4000 rpm per 1 minuto, per il secondo lavaggio sono stati utilizzati 750 µl di tampone PE e si è centrifugato come descritto sopra. Per allontanare ogni traccia di etanolo presente nei diversi tamponi utilizzati, è stata effettuata un' ultima centrifugata a 11000 rpm per 1 minuto. Successivamente le colonnine sono state poste in eppendorf sterili e il DNA plasmidico è stato eluito aggiungendo 50 µl di TE (Tabella 5) al centro della colonnina e raccolto nelle rispettive eppendorf dopo una centrifugazione di 2 minuti ad 11000 rpm.

Si è effettuata una lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm, utilizzando uno spettrofotometro AGILENT 8453E UV-Visible e la concentrazione del plasmide è stata determinata utilizzando la relazione:

$1 \text{ O.D. } \lambda 260 \text{ nm} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml} \text{ di DNA plasmidico.}$

Per valutare il grado di purezza del DNA plasmidico estratto ed escludere la presenza di RNA, aliquote di 1 µg sono state analizzate su gel di agarosio 1% in TBE 1x (Tabella 5) contenente 0,5 µg/ml di bromuro di etidio.

Maxpreparazione di DNA plasmidico

La preparazione del DNA plasmidico è stata effettuata utilizzando il Kit di purificazione della QIAGEN, seguendo il relativo protocollo.

Per ottenere preparazioni di maggiori quantitativi di DNA plasmidico sufficientemente purificato, necessario per le successive fasi sperimentali, è stato effettuato un inoculo di 100 µl di stock in glicerolo in 100 ml di terreno di coltura Luria-Bertani (LB) a cui sono stati aggiunti 100 µl di ampicillina [10 mg/ml]; la coltura batterica è stata messa a 37°C con agitazione costante (270 rpm) per tutta la notte. Il giorno successivo, i batteri sono stati raccolti centrifugando a 3000 rpm per 10 minuti in centrifuga Beckman con rotore GH 3.7. Il precipitato è stato risospeso in 10 ml di tampone P1 e lasciato 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver aggiunto 10 ml di tampone P2, ed aver mescolato per inversione ripetutamente, è stato incubato a temperatura ambiente altri 5 minuti. Dopo aver aggiunto 10 ml di tampone P3, aver mescolato delicatamente e incubato in ghiaccio per 20 minuti, i campioni sono stati centrifugati a 10000 rpm per 30 minuti a 4°C, in centrifuga Beckman J2-MC con rotore JA20.

Il supernatante è stato applicato ad una colonna tip-500 QiagenTM, pre-equilibrata con 10 ml di tampone QBT. Dopo aver lavato la resina due volte con 10 ml di tampone QC, il DNA è stato eluito con 15 ml di tampone QF (Tabella 6), precipitato con 0,7 volumi di isopropanolo a temperatura ambiente, e centrifugato 30 minuti a 4°C come sopra descritto.

Eliminato il supernatante, il precipitato di DNA plasmidico è stato lavato con 2 ml di etanolo 70% a temperatura ambiente, è stato centrifugato a 10000 rpm per 10 minuti ed il pellet è stato risospeso in 200-500 µl di TE. Da questo protocollo si sono ottenuti generalmente 0,2-1 mg di DNA plasmidico.

Sintesi degli oligonucleotidi

Tutti gli oligonucleotidi sintetici impiegati sono stati preparati con un apparecchio Beckman SM-DNA Synthesizer dal Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica "Anton Dohrn" di Napoli.

Sequenziamento del DNA plasmidico

Tutte le sequenze sono state effettuate con un apparecchio Beckman CEQ 2000XL DNA Analysis System dal Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli.

Analisi delle sequenze

Le sequenze di DNA dei geni *soul/hbp* sono state confrontate con la collezione di sequenze depositate nelle banche dati GenBank e TIGR,. Le comparazioni tra l'omeodominio dedotto di *D. rerio* ed i corrispondenti omologhi di altre specie animali sono state effettuate mediante il software LOGO

Per l'individuazione dei cladi filogenetici è stato consultato il programma di filogenesi Neighbour-Joining

Preparazione di RNA totali da embrioni e tessuti di Danio rerio

Gli embrioni e tessuti raccolti, sono stati congelati in azoto liquido e pestati fino allo stato di polvere. I tessuti selezionati e i vari stadi embrionali sono stati i seguenti:

- 1) Milza
- 2) 24 hpf
- 3) Cuore
- 4) Muscolo
- 5) Cervello
- 6) Intestino
- 7) Testicolo
- 8) Fegato
- 9) 4-16 cellule
- 10) Bud
- 11) Shield
- 12) 75%epibolia
- 14) 48 hpf
- 15) 5 giorni
- 16) 3 settimane
- 17) 1 mese
- 18) 2 mesi maschio
- 19) 1+1/2 mese

20) 2 mesi femmina

21) ovario

Il protocollo seguito per l'estrazione dell'RNA è quello del RNasy Mini Procedure della Quiagen (fig 14)

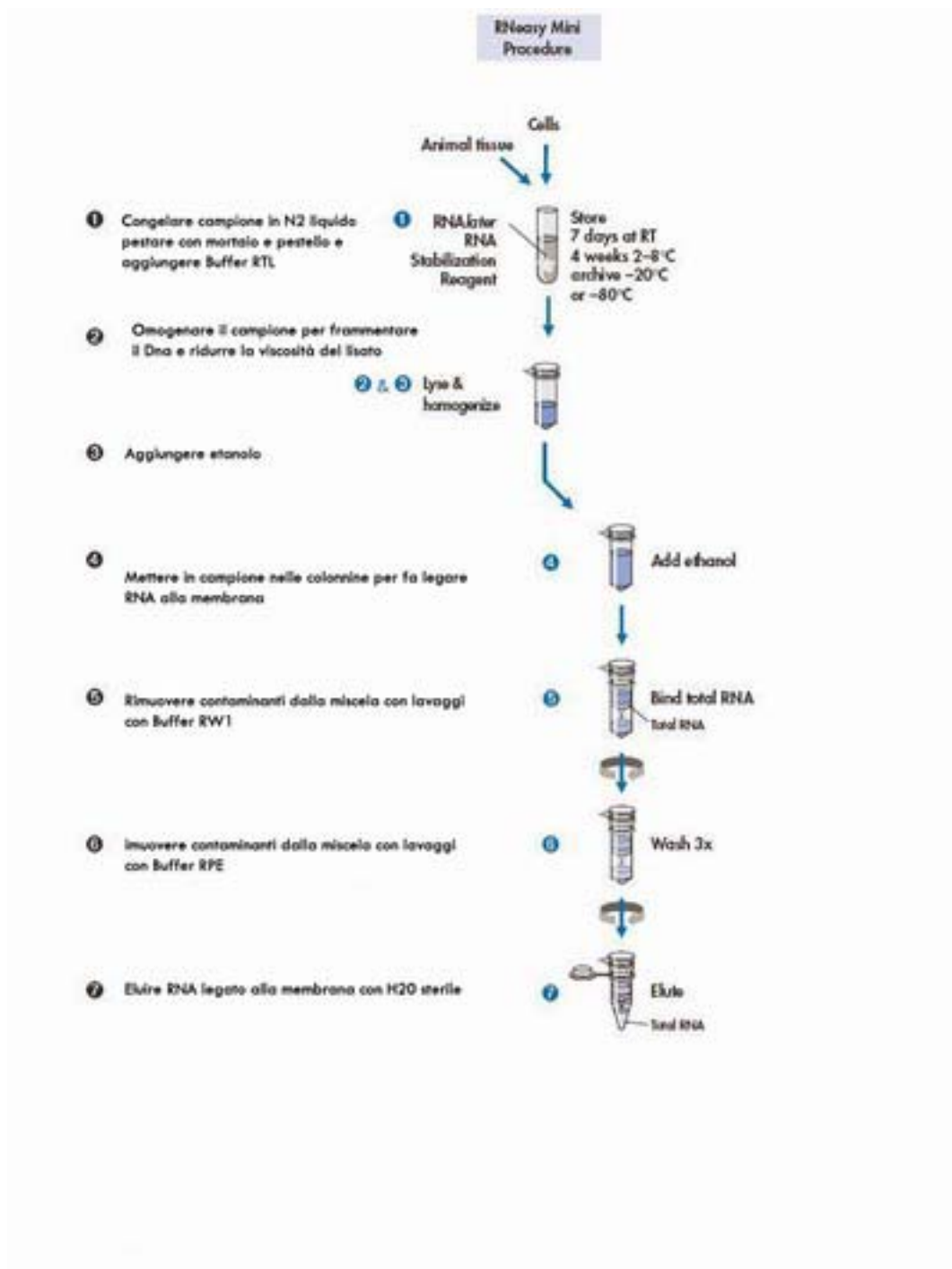


Fig 13: Protocollo di estrazione di RNA totale

Sintesi del cDNA

La sintesi del cDNA viene effettuata a partire da RNA totali a diversi stadi di sviluppo embrionale e da alcuni tessuti. La miscela di reazione è composta da RNA totali 5 g, innesco(oligo dT) (50 ng/ μ l), ed H₂O sterile per un volume finale di 12 μ l. Sono stati utilizzati come innesco primers random non specifici forniti dal kit GIBCO-BRL utilizzato. Dopo 10 minuti a 70°C la miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 2 minuti ,in seguito si è centrifugato a 4000g per 10'.

: Successivamente sono stati aggiunti

| | |
|--------------------------|-----------|
| Tampone PCR 10 X (Tab.5) | 2 μ l |
| RNasi Out | 1 μ l |
| dNTP miscela 10 mM | 1 μ l |
| DTT 0.1 M | 2 μ l |

Il tutto è stato portato alla temperatura di 42°C per 2 minuti, dopodichè è stato aggiunto 1 μ l di Trascrittasi inversa Superscript II (200 U/ μ l).

La reazione è stata condotta a 42°C per 50 minuti e, al termine, l'enzima è stato inattivato a 70°C per 15 minuti.

Amplificazione mediante PCR

La PCR è una tecnica che permette l'amplificazione di una regione di DNA compresa tra due oligonucleotidi. Il DNA stampo viene denaturato per far sì che ai singoli filamenti prodotti possano associarsi due inneschi complementari alle sequenze che delimitano la regione che si desidera amplificare.

Una DNA polimerasi termoresistente utilizza questi inneschi per polimerizzare il secondo filamento e le doppie eliche così ottenute vengono nuovamente denaturate per essere riutilizzate come stampi per la reazione successiva.

La reazione si ripete per il numero di volte desiderato, producendo una grande quantità della regione di DNA compresa tra i due inneschi.

I due inneschi, nel caso di *soulA*, sono l'oligo al 5' corrispondente alla sequenza nucleotidica dedotta dalla regione amminoacidica V L G E I Q L S I e l'oligo al 3' corrispondente alla sequenza nucleotidica dedotta dalla regione amminoacidica L W K L T L L H H. Nel caso di *soulB* l'oligo al 5' corrisponde alla sequenza amminoacidica V G H Q K W, mentre l'oligo al 3' corrisponde alla sequenza amminoacidica Q W W L T H Q T .

Ogni reazione è stata condotta in un volume totale di 50 µl con i seguenti componenti:

| | |
|-----------------------------------|--------|
| DNA | 100 ng |
| Tampone di sintesi 10x (Tab.5) | 5 µl |
| dNTP 10 mM | 5 µl |
| innesco 5' (100 pmol / µl) | 1 µl |
| innesco 3' (100 pmol / µl) | 1 µl |
| Taq DNA polimerasi (0.5 u / µl) | 1 µl |

La miscela è stata tenuta alla temperatura di denaturazione di 94°C per 5 minuti. I successivi cicli di amplificazione, di seguito descritti, sono stati condotti mediante un Thermal cycler Perkin-Elmer-Cetus. Dopo la denaturazione la miscela è stata portata alla temperatura di “annealing” (54°C) compatibile con gli oligonucleotidi usati, per 2 minuti, l'allungamento è avvenuto a 72°C per 1,30 minuti. Tale ciclo di amplificazione è stato ripetuto per 35 volte. Inoltre per migliorare l'efficienza di amplificazione (quantità elevata del prodotto) e la specificità (nessun prodotti non

specifici) del prodotto di PCR, si è aggiunto DMSO (dimetil solfossido) pari al 5% del volume finale. Ovviamente come controllo del programma PCR, su ciascuno dei campioni è stata fatta una PCR per amplificare il gene *EF.α 1* (elongation factor) che è un fattore ubiquitario in tutte le cellule e codifica per una proteina implicata nell'allungamento della catena peptidica durante la biosintesi delle proteine.

Al termine dei 35 cicli, 20 µl della reazione sono stati analizzati su un gel di agarosio 1% in TBE 1x. Il rimanente della miscela è stato conservato a 4°

Trascrizione in vitro di mRNA

Per la sintesi di RNA messaggeri "senso" ed "antisenso" corrispondenti al frammento di cDNA identificato ma privato della regione codificante per i domini a dita di zinco, si è proceduto inizialmente ad una digestione con gli enzimi di restrizione *EcoRV* per *soulA* in p*Bluescript* KS II+ e *XhoI* per *soulB* in pCR® II-TOPO® che linearizzano i vettori. Tali plasmide possiedono a monte e a valle del sito di clonaggio due promotori, T3 e T7,(p*Bluescript* KS II+) e SP6(pCR® II-TOPO®) riconosciuti da specifiche RNA polimerasi che possono produrre, perciò, trascritti del frammento contenuto nel vettore ricombinante.

| | |
|-----|-------|
| DNA | 20 µg |
|-----|-------|

| | |
|------------------|------|
| Enzima (10 U/µl) | 4 µl |
|------------------|------|

| | |
|-------------|------|
| Tampone 10x | 5 µl |
|-------------|------|

aggiungendo H₂O per un volume finale di 50 µl.

I plasmidi così linearizzati sono stati separati elettroforeticamente, recuperati dal gel di agarosio 1% con l'utilizzo del kit Biorad.

Per liberarsi dalla presenza di eventuali proteine contaminanti, che potrebbero creare problemi nei passaggi successivi, si è proceduto al trattamento dei campioni con proteinasi K (50 µg/ml) ed SDS 1% ad una temperatura di 45°C per 30 minuti. Si è effettuata, quindi, un'estrazione con un volume di: fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (25:24:1) ed una seconda estrazione con un volume di cloroformio:alcool isoamilico (24:1). Infine una precipitazione del DNA plasmidico con: Na Acetato 0,3 M finale pH 5,2 Etanolo assoluto 2,5 volumi alla temperatura di -80°C per 30 minuti.

Dopo la precipitazione il DNA è stato lavato con etanolo al 70% per allontanare eventuali sali presenti e quindi risospeso in H₂O sterile in un opportuno volume.

Aliquote di ognuno dei due campioni vengono analizzate su gel di agarosio 1% in TBE 1x per valutarne la concentrazione.

La trascrizione in vitro è stata effettuata utilizzando il kit DIG-RNA “ labeling “ fornito dalla ditta Boehringer.

Con questo sistema è possibile marcare l'RNA messaggero prodotto in vitro usando la digossigenina , un composto steroide, isolato dalla pianta *Digitalis planaria*, che funziona come aptene legato covalentemente, attraverso un braccio spaziatore contenente undici atomi di carbonio, alla posizione C-5 dell' UTP.

Il precursore DIG-UTP verrà incorporato nel frammento di RNA neosintetizzato in quanto riconosciuto come un "comune" nucleotide dalle RNA polimerasi utilizzate, producendo così sonde di RNA marcate.

Per produrre gli RNA messaggeri, senso ed antisenso, è stata dunque preparata la seguente miscela di reazione:

| | |
|---------------------------------|------|
| DNA plasmidico linearizzato | 1 µg |
| Miscela di NTP 10x | 2 µl |
| Tampone di trascrizione 10x | 2 µl |
| Inibitore delle RNAsi (20 U/µl) | 1 µl |
| T7 RNA polimerasi (20 U/µl) | 2 µl |
| oppure | |
| T3 RNA polimerasi (20 U/µl) | 2 µl |
| oppure | |
| SP6 polimerasi | 2 µl |

aggiungendo H₂O trattata con DEPC fino ad un volume finale di 18 µl.

La reazione di sintesi è stata effettuata alla temperatura di 37°C per 2 ore, successivamente sono stati aggiunti 2 µl di DNasi I, priva di attività RNAsica, (10 U/µl) ed il tutto incubato ancora a 37°C per 10 minuti, per rimuovere il DNA stampo. La reazione è stata, infine, bloccata mediante aggiunta di 2 µl di EDTA 0,2 M pH 8.

Quantizzazione delle sonde ad RNA

Per valutare la concentrazione degli RNA, prodotti per trascrizione in vitro, è stato utilizzato un saggio immunoenzimatico, ricorrendo all'utilizzo di anticorpi anti-digossigenina coniugati con l'enzima fosfatasi alcalina.

Fatta avvenire l'interazione tra l'anticorpo ed il corrispondente aptene, DIG-UTP, la visualizzazione delle molecole di RNA viene realizzata attraverso una successiva reazione colorimetrica catalizzata dalla fosfatasi alcalina.

Tale enzima in presenza di due substrati, il 5-bromo-4 cloro-3 indolil-fosfato (BCIP) ed il sale Nitroblu di tetrazolio (NBT) produce un substrato insolubile di colore blu.

Dal confronto qualitativo dell'intensità delle macchie prodotte da diverse diluizioni di un RNA controllo con quelle prodotte dall'RNA da utilizzare si risale alla determinazione della sua concentrazione.

Sono state preparate varie diluizioni dell'RNA controllo e dell'RNA del quale era necessario determinare la concentrazione utilizzando il tampone 1 (Tabella 7); 1 µl di ogni diluizione è stato quindi depositato su un filtro di nylon che è stato, quindi, esposto a radiazioni UV per 30 secondi per consentire all'RNA di legarsi al filtro.

Il filtro è stato posto 2 minuti in SSC 2x con una leggera agitazione, quindi per 30 minuti nel tampone 2 (Tabella 7), lo stesso in cui verrà aggiunto l'anticorpo anti-DIG AP (0,15 U/ml) che sarà incubato a temperatura ambiente per 1 ora.

Per rimuovere gli anticorpi non legati sono stati effettuati, quindi, due lavaggi di 15 minuti con il tampone 2.

Il filtro è stato, poi, equilibrato per cinque minuti nel tampone 3 (Tabella 7) di rivelazione e, successivamente, incubato al buio in una soluzione di rivelazione così composta:

| | |
|-----------------|-------|
| Tampone 3 | 10 ml |
| BCIP (50 mg/ml) | 33 µl |
| NBT (50 mg/ml) | 66 µl |

Il precipitato colorato comincia a formarsi dopo pochi minuti; la reazione è stata quindi bloccata dopo 10 minuti lavando il filtro sotto l'acqua corrente.

Ibridazione in situ whole mount

L'ibridazione in situ con gli RNA marcati con digossigenina è stata effettuata su embrioni interi decorionati ,segundo il protocollo *C.Thisse and B. Thisse*

Gli embrioni da sottoporre all'esperimento sono fissati e conservati in MeOH 100%, per l'utilizzo vengono reidratati via via con lavaggi in MeOH al 75%,50%,e 25% e con lavaggi in PBT.

Successivamente vengono sottoposti alla Proteinasi K che ha il compito di denaturare tutte le proteine dell'embrione.

Al termine della esposizione alla Proteinasi K , gli embrioni vengono dapprima fissati in PFA al 4% in PBS per 20 minuti e poi lavati in PBT.

In seguito gli embrioni vengono lavati con una soluzione di preibridazione per 2 ore ad una temperatura di 62°C., al termine delle 2 ore si aggiungono dai 100 ai 200 ng di sonda antisenso e la si lascia ibridare tutta la notte.

Il giorno seguente gli embrioni vengono lavati con la soluzione di ibridazione e SSC a 62°C. In seguito i lavaggi vengono eseguiti con SSC a concentrazioni decrescenti a temperatura ambiente.

Poi i campioni vengono incubati in anticorpo DIG antiserum (1:5000) tutta la notte a 4°C.

Il terzo giornosi lavano gli embrioni dall'anticorpo residuo, e si passa alla "detection" con NBT e BCIP(50mg/ml) in staining buffer.

La reazione ,una volta che gli embrioni si sono colorati, vengono lavati in PBT e fissati in PFA 4% in PBS a 4°C.

Gli embrioni possono così essere fotografati.

Microiniezioni di oligonucleotidi antisenso (morpholino) in uova fecondate

I morfolino (fig 14a) sono degli oligonucleotidi antisenso di lunghezza variabile tra le 18 e 25 basi nucleotidiche complementari alla sequenza del gene di interesse. La funzione principale è quella di bloccare la traduzione del mRNA e quindi la sintesi della proteina (Fig 14b).

Nel nostro caso specifico gli oligonucleotidi antisenso da noi disegnati sono stati forniti come prodotto liofilizzato dalla Gene Tools, LLC.

Morfolino di *hbp2a* : **5' AGTTTGACCGATGGCTTTAAGCATC 3'**

Morfolino di *hbp2b* : **5' GCAGAAGCCACAATACATCGCCATTT 3'**

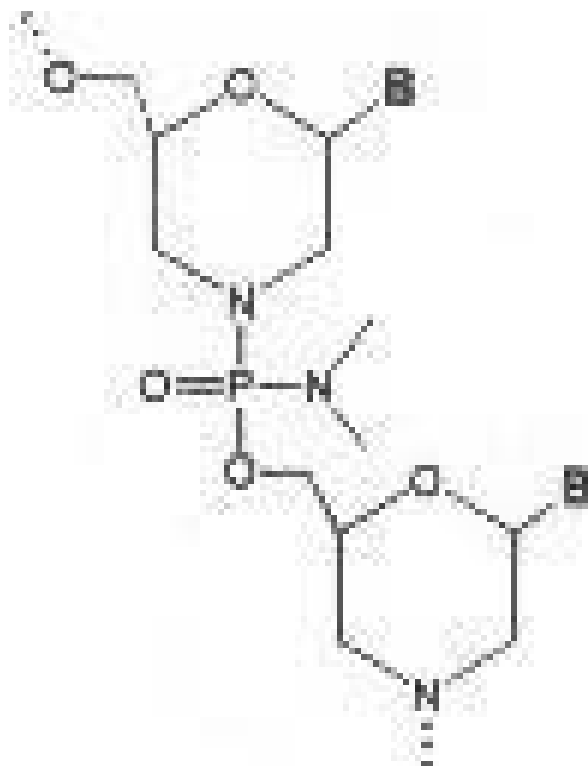


Fig 14(a): Morfolino

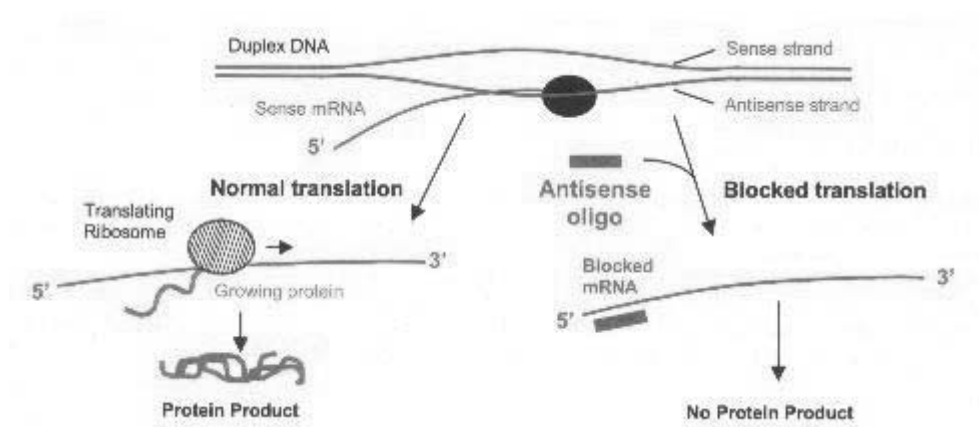


Fig 14(b): Morfolino, meccanismo di azione

Le microiniezioni con oligonucleotidi antisenso (morfolino) vengono effettuate seguendo il protocollo di *Darrent T. Gilmour et al 2000* .

Il settaggio completo (Foto 2) è formato da uno steriomicroscopio Zeiss, un micromanipolatore modello serie MN della Narishige e da un Picospritzer® III della Parker Instrumentation.

Le uova appena fecondate, vengono raccolte, pulite e orientate col polo animale verso il capillare. (Fig 15) Gli aghi utilizzati per la microiniezione, vengono ricavati da tubi capillari (Microcaps da Drummond Sci. Co., Broomall, PA, USA), opportunamente tirati con un macchinario specifico “microelectrode puller”, (Model PN-3, Narishige, Tokyo) scegliendo caratteristiche di pressione, temperatura ecc ,più idonei alle esigenze di microiniezione.

Una volta preparati gli aghi, questi vengono riempiti con una soluzione contenente un range di concentrazione di morfolino tra 10 μ M e 10mM in acqua sterile contenente come marcatore colorante 0,5% di Phenol Red (Sigma) e microiniettati nelle uova fecondate. Il volume iniettato è stimato essere circa il 5% del volume delle uova controllando la quantità di Phenol Red co-iniettato.

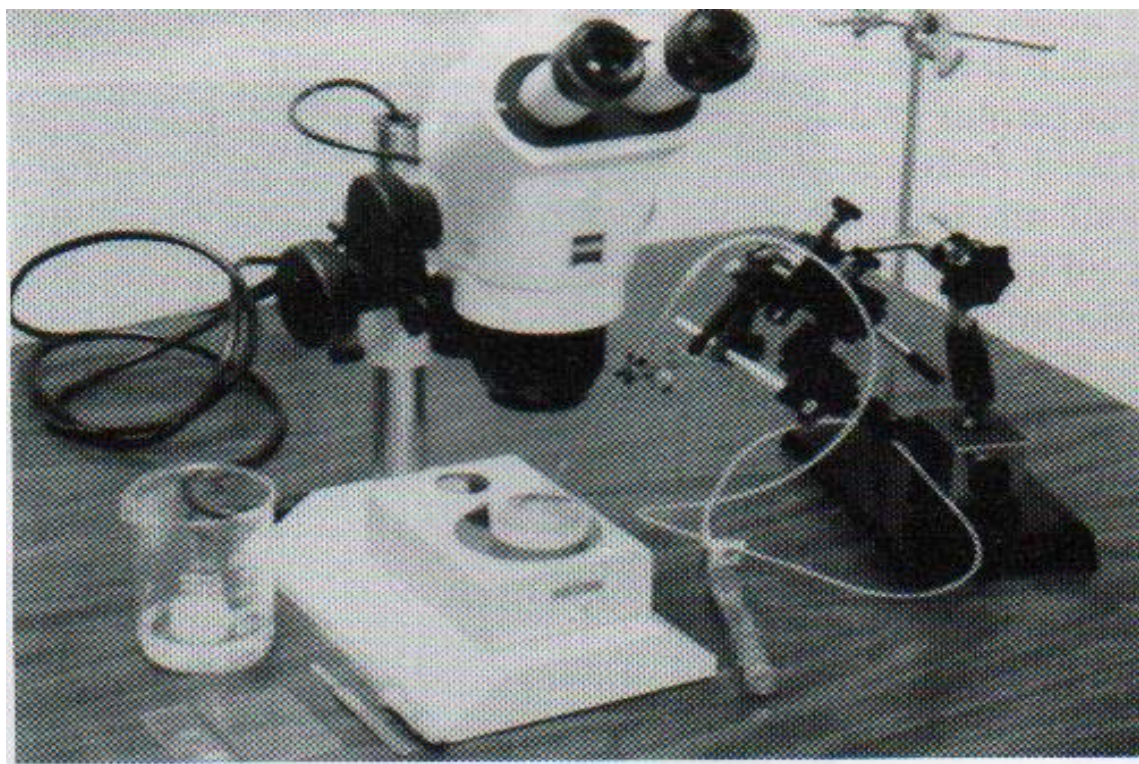


Fig 15:settaggio per la microiniezione

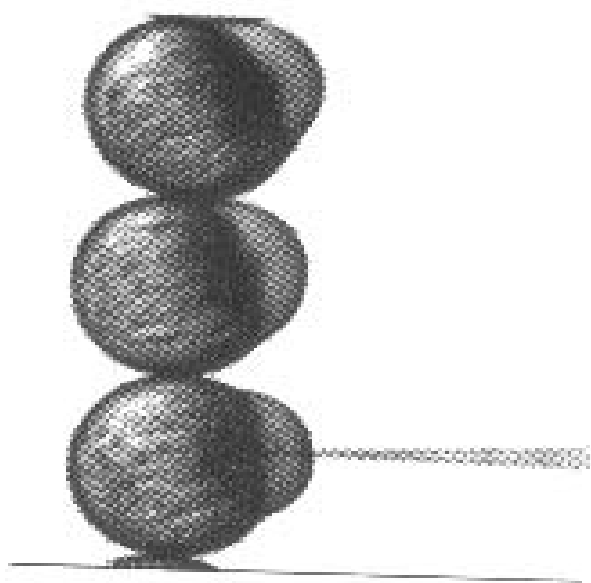


Fig 16 : Uova fecondate e orientate col polo animale verso il capillare

Colorazione della emoglobina embrionale sui morfanti con o-dianisidina

Gli embrioni microiniettati con il morfolino, sono stati tenuti a 28°C in H₂O di fecondazione e lasciati sviluppare. Allo stadio di 24hpf ,48 hpf e 72hpf sono stati colorati con una soluzione di o-dianisidina (620µg/ml) in NaOH (10mM a ph 4.5) con 0.65% di H₂O₂. L'esposizione è durata 15 minuti, dopodichè l'emoglobina contenuta nel sangue subisce una reazione cromatica piu o meno forte a seconda della quantità di substrato cioè di o-dianisidina ossidata. Che si è legata alla emoglobina.

Il perossido d'idrogeno presente nella miscela ossida, in una reazione catalizzata da una perossidasi, la o-dianisidina, che nella sua forma ossidata è colorata e presenta un massimo di assorbimento a 440 nm:



Successivamente gli embrioni sono stati lavati in H₂O di fecondazione e fissati in paraformaldeide 4% in PBS.

Gli embrioni sono stati poi osservati al microscopio e fotografati.

Embrioni di Zebrafish mutanti

Per le nostre sperimentazioni sono stati utilizzati degli embrioni mutanti per gentile concessione del laboratorio del Prof. Leonard Zon della Harvard Medical School in Boston ,USA.

Tre sono state le mutazioni di interesse ,quali quelle che riguardano le anemia ipocromica di tipo embrionali e adulte:

weissherbst (*weh*) = mutante del gene della *ferroportina 1* (Donovan et al. 2000)

chardonnay (*cdy*) = mutante del gene *divalent metal transporter 1* (DMT1) (Donovan et al. 2002)

chianti (*cia*) = mutante del gene del *recettore 1 della transferrina* (tfr1a) (R. Wingert et al . 2004)

Gli embrioni mutanti sono stati così ottenuti (fig18):

i parentali, cioè una femmina wt e due maschi trattati con *etilnitrourea* (ENU) per indurre mutazioni in spermatogoni., sono stati incrociati per creare la generazione F1 .

I pesci eterozigoti F1 recanti la mutazione (tratto rosso) sono stati accoppiati con individui wilde type per creare la generazione F2

Incroci casuali tra ogni singolo membro della generazione F2 hanno poi permesso di identificare l'animale recante la mutazione.

L'incrocio tra due omozigoti ($+/+$)oppure tra un omozigote ($+/+$) o un eterozigote ($+/m$) darà tutti individui wilde type..

Incrociando due eterozigoti ($+/m$) si avrà come risultato il 25% di mutanti (in rosso) e il 75% di wilde type.

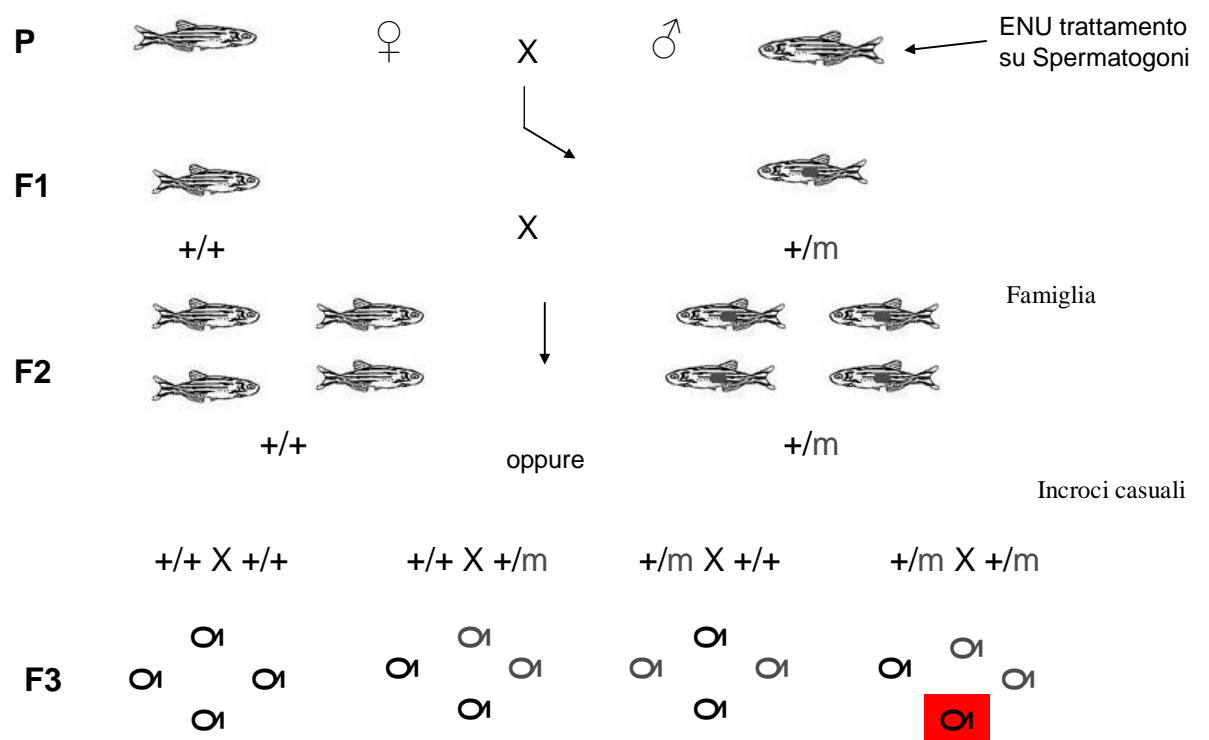


Fig 17:Screen mutagenetico in Zebrafish

Tabelle delle soluzioni

Tamponi impiegati per la preparazione degli RNA totali e del cDNA

Tampone RTL

| | |
|--------------------------|--------|
| NaCl | 200 mM |
| Tris-HCl (pH 7,5) | 200 mM |
| MgCl ₂ | 1,5 mM |
| SDS | 2 % |
| “Protein/RNase Degrader” | 20 µl |

Tampone RW1

| | |
|-------------------|--------|
| NaCl | 250 mM |
| Tris-HCl (pH 7,5) | 10 mM |

Tampone di RPE

| | |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl (pH 7,5) | 10 mM |
|-------------------|-------|

Tamponi impiegati per reazioni di Marcatura terminale, PCR e Ligasi

Tampone della T4 Polinucleotide Chinasi (10x):

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl (pH 7,5) | 500 mM |
| MgCl ₂ | 100 mM |
| DTT | 50 mM |
| Spermidina | 1 mM |

Tampone di Sintesi (10x):

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl (pH 8,4) | 200 mM |
| KCl | 500 mM |

Tampone di Ligasi (10x):

| | |
|-------------------|-----------|
| Tris-HCl (pH 7,6) | 200 mM |
| MgCl ₂ | 50 mM |
| DTT | 50 mM |
| BSA | 500 mg/ml |

Terreni di Coltura

LB – Mezzo di Luria Bertani (1 l)

| | |
|---------------------|-------|
| NaCl | 10 gr |
| Bacto-Tryptone | 10 gr |
| Estratto di lievito | 5 gr |

SOB

| | |
|---------------------|-----------------|
| Tryptone | 20 gr |
| Estratto di lievito | 5 gr |
| NaCl 5 M | 2 ml |
| KCl 1 M | 2,5 ml |
| H ₂ O | fino ad 1 litro |

SOC

Aggiungere al SOB:

| | |
|-----------------------|-------|
| MgSO ₄ 1 M | 10 ml |
| MgCl ₂ 1 M | 10 ml |
| Glucosio 1 M | 20 ml |

Soluzioni per elettroforesi e per solubilizzare il DNA plasmidico

TBE 10x (1 l)

| | |
|---------------------|--------|
| Tris | 108 gr |
| Acido Borico | 55 gr |
| EDTA 0,5 M (pH 8,0) | 40 ml |

TE

| | |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl (pH 8,0) | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

Soluzioni impiegate per mini- e maxi-preparazioni di DNA plasmidico

Tampone QBT

| | |
|---------------|--------|
| NaCl | 0,75 M |
| MOPS (pH 7,0) | 50 mM |
| Etanolo | 15 % |
| Triton X-100 | 0,15 % |

Tampone QC

| | |
|---------------|-------|
| NaCl | 1 M |
| MOPS (pH 7,0) | 50 mM |
| Etanolo | 15 % |

Tampone QF

| | |
|---------------|--------|
| NaCl | 1,25 M |
| MOPS (pH 8,2) | 50 mM |
| Etanolo | 15 % |

Tamponi impiegati per la trascrizione *in vitro*, l'immunorivelazione e l'ibridazione *in situ*

Tampone 1 -MBT-

| | |
|------------------------|-------|
| Acido maleico (pH 7,5) | 0,1 M |
|------------------------|-------|

| | |
|------|--------|
| NaCl | 0,15 M |
|------|--------|

Blocking Stock Solution

"Blocking reagent" disciolto in MBT ad una concentrazione finale di 10% (w/v).

Tampone 2

"Blocking stock solution" diluita 1:10

Tampone 3

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl (pH 9,5) | 100 mM |
| NaCl | 100 mM |
| MgCl ₂ | 50 mM |

Tampone di Diluizione

H₂O DEPC : SSC 20x : Formaldeide (5:3:2)

NTP (Nucleotidi Trifosfati)

| | |
|---------|--------|
| ATP | 10 mM |
| CTP | 10 mM |
| GTP | 10 mM |
| UTP | 6,5 mM |
| DIG-UTP | 3,5 mM |

Tampone di Trascrizione

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl (pH 8,0) | 400 mM |
| MgCl ₂ | 60 mM |
| DTT | 100 mM |
| Spermidina | 20 mM |

Soluzione di Ibridazione

| | |
|----------------------|----------|
| Formammide | 50 % |
| SSC | 5x |
| tRNA | 50 µg/ml |
| Soluzione di Denhart | 5x |
| Tween 20 | 0,1 % |
| Eparina | 50 µg/ml |

Staining buffer

| | |
|-------------------|-------|
| NaCl | 0,5 M |
| Tris-HCl (pH 8,0) | 10 mM |
| EDTA | 5 mM |
| Tween 20 | 0,1 % |

Tampone AP

| | |
|-------------------|--------|
| NaCl | 100 mM |
| MgCl ₂ | 60 mM |
| Tris-HCl (pH 9,5) | 100 mM |
| Tween 20 | 0,1 % |

PBS (Tampone Salino Fosfato)

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 200 mM |
| KCl | 3 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 10 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 2 mM |

Abbreviazioni

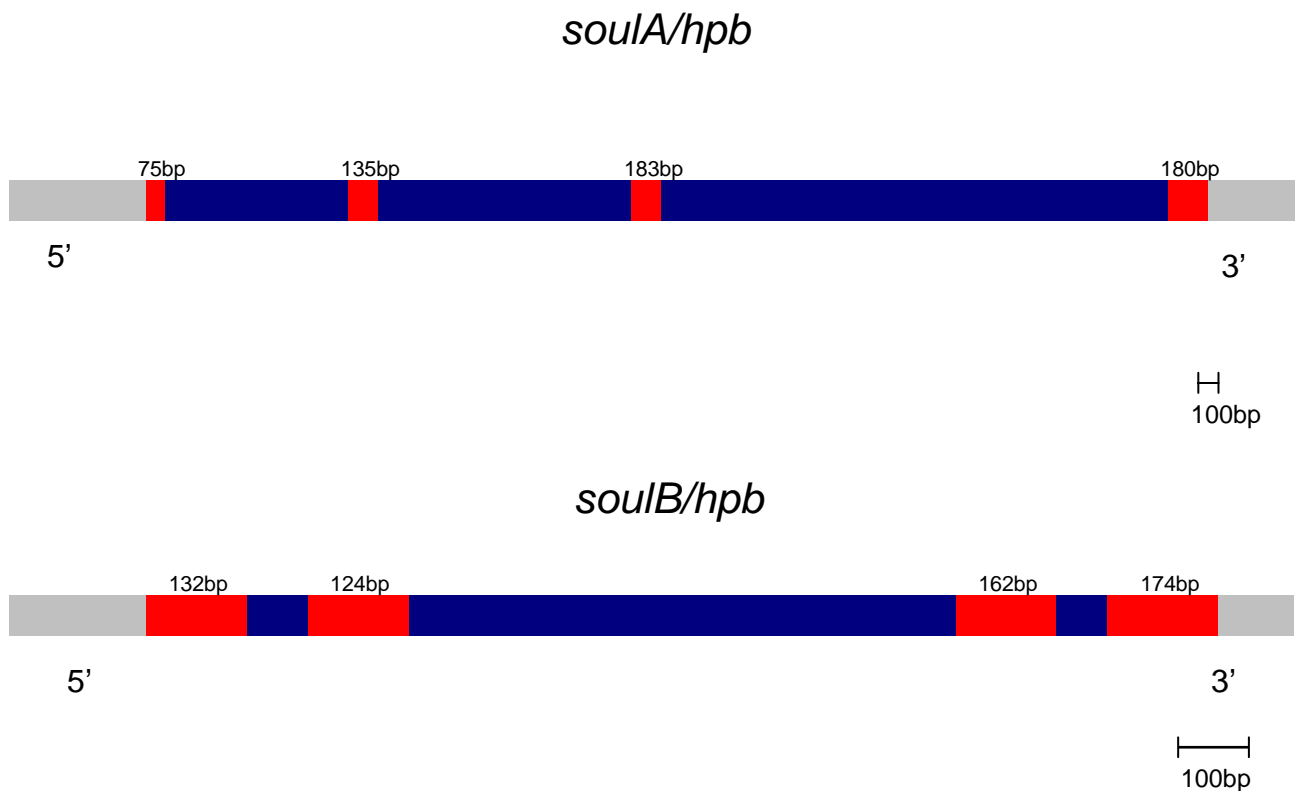
DEPC: Dietilpirocarbonato

SSC: Sodio Salino Citrato

RISULTATI

Analisi delle sequenze di *soul A* e *soul B*

Nella figura a e b, è riportata la schematizzazione dei geni *soulA/hbp* e *soulB/hbp*; entrambi sono costituiti da quattro esoni (in rosso) spazati da tre introni (in blu) entrambi i geni hanno una regione codificante di circa 1500 paia di basi dedotte da database NCBI e TGIR. Di seguito sono riportate le sequenze nucleotidiche della regione codificante a partire dall' ATG di inizio con le relative sequenze amminoacidiche a partire dalla metionina di inizio.



Schema a-b: rappresentazione grafica degli esoni (rossi) e introni (blu) di *soulA/hbp* e *soulB/hbp*

Soul A D.rerio

cagttttaagtcgagatgagttttaagtcgagatgcatcggtcaaactctgttttc
- M L K A I G Q T L F S T G L
caaaaccccaaatacacagctcaggagagtaagggtgatgactatgaagtccgcacctac
Q N P K Y T A Q E S K G D D Y E V R T Y
caagcaacaaactgggtaagcacagttgtgactggcatggagcaggaccaagccatgagc
Q A T N W V S T V V T G M E Q D Q A M S
acaggctttagaagactcttcaatacattcagggcagtaatgaaagaagagtaagggtg
T G F R R L F K Y I Q G S N E K K S K V
gagatgacgacaccgggtgagttgtttgattgaccctggagcgggacctgcatgtgaaagc
E M T T P V S C L I D P G A G P A C E S
accttcactgtgtccttttacatccctgaggaacatcaagctgaccctcccaaaccact
T F T V S F Y I P E E H Q A D P P K P T
gaccagatgttttatcgagagcagaaaagagctcactgcattcgtcaggaccttttgt
D P D V F I E S R K E L T A F V R T F G
ggctttgctaacagtgagagctgctgtgaggagattctcaagctcatagaaagcctcaag
G F A N S E S C C E E I L K L I E S L K
agggatggcatgaaattcaaagaggcaccatattaccgagcaggatacgacagtccttc
R D G M K F K E A P Y Y R A G Y D S P F
Aaactcaccggccgcaggaacgaagtctggctcatcaaagatgagga
K L T G R R N E V W L I K D E E

Proteina:

1 MLKAIGQTLF STGLQNPKYT AQESKGDDYE VRTYQATNWW STVVTGMEQD QAMSTGFRRL
61 FKYIQGSNEK KSKVEMTTPV SCLIDPGAGP ACESTFTVSF YIPEEHQADP PKPTDPDVFI
121 ESRKELTAFV RTFGGFANSE SCCEEILKLI ESLKRDGMKF KEAPYYRAGY DSPFKLTGRR
181 NEVWLIKDEE

Soul B D.rerio

atggcgatgtatgtggcttctgctctgtgtctcctgtcggacttgatgtttcacagct
M A M Y V A S A L C L L V G L V C F T A
acagaatgttggaagcaccctggtttgccatcaaaggactgccctgtgtacactgtg
T E C W Q A P W F C H Q K D C P V Y T V
gtaaaccaatatgaaatagaagaacgcaactatgaaatgagcaactggattaccaccgat
V N Q Y E I E E R N Y E M S N W I T T D
attttaagcacaggcaaggatgatgtatcaactggattttggaaactatactattttatt
I L S T G K D D V S T G F W K L Y Y F I
caagggcaaaacaaggagaagcagattgctatgaccaggcctgtggtggtctcagtaaag
Q G Q N K E K Q I A M T R P V V V S V K
gatggtgcggaggggacgcgtctccatttctgtctttcagcaagaccccaacatcccc
D G A E G R R V S I S V F Q Q D P N I P
gatccagttgacacgactatcagaaaaacagttgttcggctgggtactgtctatgtcagg
D P V D T T I R K T V V P A G T V Y V R
tcatttgggtgggtggccatctgatcaagacgccaagataatgtgcagaagctaaaggag
S F G G W P S D Q D A Q D N V Q K L K E
gagctcaaggctccggaaagcagtttattgaagaccaatttgaagcagctgggtacgac
E L K A A G K Q F I E D Q F E A A G Y D
tcaccattggagttgctcaacaggcacaatgaagtttgggtccatgcaccctga
S P L E L L N R H N E V W V H A P -

Proteina:

1 MAMYVASALC LLVGLVCFTA TECWQAPWFC HQKDCPVYTV VNQYEIEERN YEMSNWITTD
61 ILSTGKDDVS TGFWKLYYFI QGQNKEKQIA MTRPVVSVK DGAEGRRVSI SVFQQDPNIP
121 DPVDTTIRKT VVPAGTVYVR SFGGWPSDQD AQDNVQKLKE ELKAAGKQFI EDQFEAAGYD
181 SPLELLNRHN EVWVHAP

Dall'allineamento tra i vari geni *soul/hbp* è possibile riconoscere, l'elevata conservazione di singoli residui, o di brevi sequenze, come all'estremità carbossiterminale. Visualizzati mediante il software LOGO (fig17 a), tali residui conservati possono essere ascritti, in via ipotetica, ad uno specifico valore funzionale e/o strutturale. In particolare, è interessante sottolineare la presenza di diverse proline comuni a tutti i membri della famiglia, e di un tetrapeptide posto all'estremità 3' (NEVW).

Lo studio della filogenesi molecolare dei geni *soul/hbp* ha rivelato l'elevata conservazione di questa famiglia di geni e altresì l'esistenza di diversi raggruppamenti o sottoraggruppamenti, di questa famiglia, (fig17b) sia dal punto di vista strutturale che filogenetico. In particolare, il programma di filogenesi Neighbour-Joining distingue tre principali cladi filogenetici, il primo caratterizzato da geni di batteri e piante, (ramo verde) il secondo contenente sequenze distribuite lungo l'intero arco sistematico incluso nella nostra analisi, (ramo giallo) ad eccezione dei batteri, ed il terzo apparentemente specifico dei Cordati. (ramo rosso) Inoltre, è possibile distinguere due principali sottocladi all'interno del secondo raggruppamento (ramo giallo), presumibilmente corrispondenti a sottofamiglie.

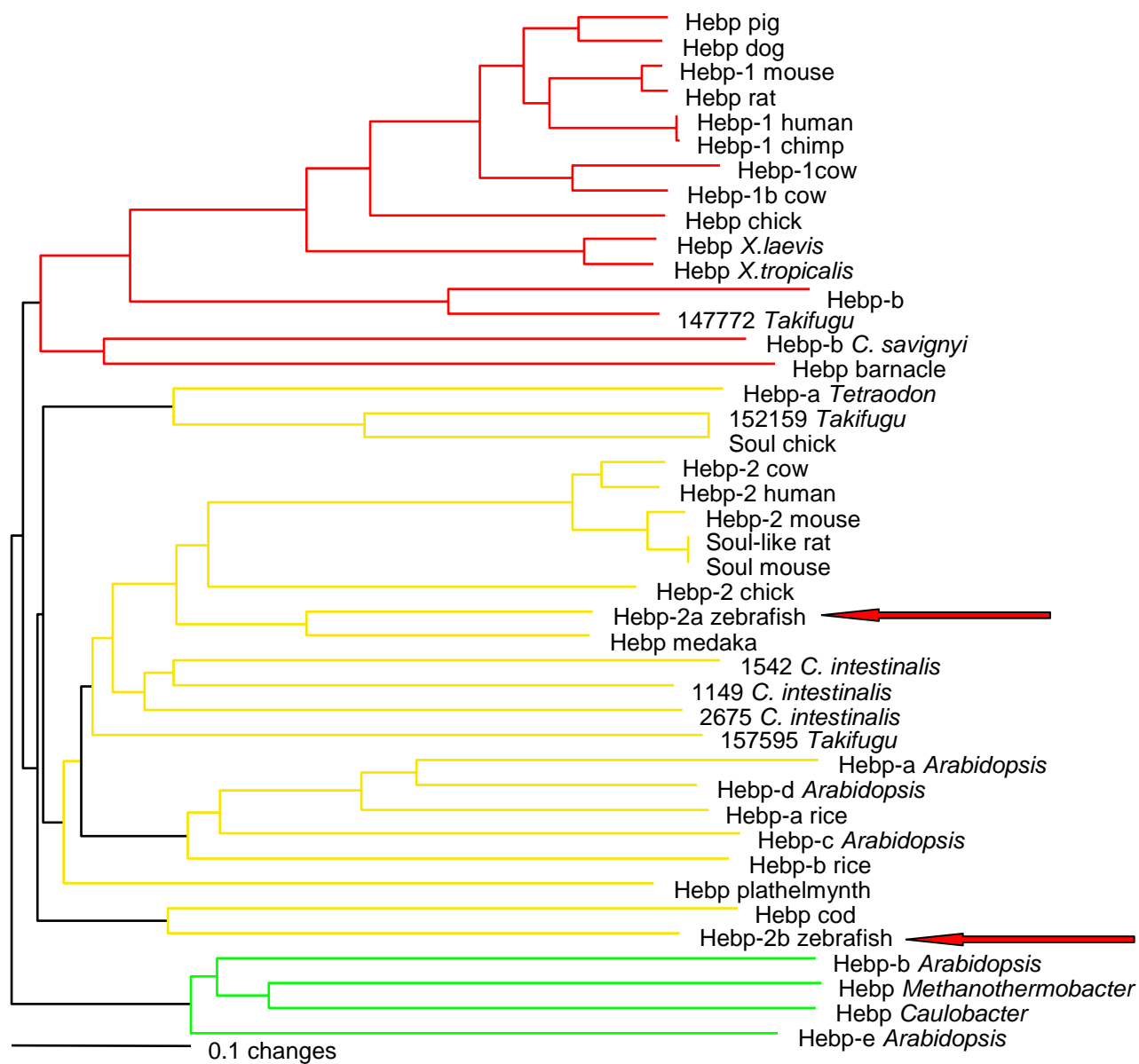


Fig 18 b: albero filogenetico di *soulA/hbp* e *soulB/hbp*

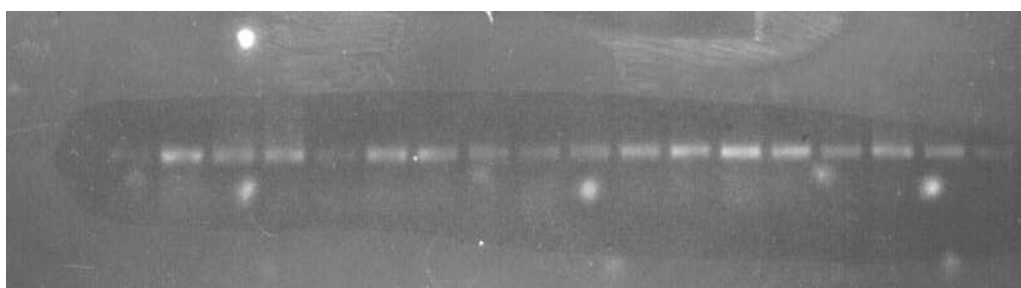
Analisi della RT-PCR di *soula*

Qui sotto è riportato il risultato della RT-PCR effettuato con RNA totali estratti da embrioni a vari stadi di sviluppo e di tessuti di *D.rerio*. Altresì per controllare la bontà dell'RNA estratto, la retrotrascrizione e il programma PCR, è stato eseguito un controllo sui medesimi stadi di sviluppo e sui medesimi tessuti, utilizzando il cDNA di *EF α 1 elongation factor* essendo un gene espresso in tutti gli stadi di sviluppo embrionale e in tutti i tessuti.

Nelle corsie da 1 a 21 sono riportati rispettivamente il cDNA di *soula*

- 13) Milza
- 14) 24 hpf
- 15) Cuore
- 16) Muscolo
- 17) Cervello
- 18) Intestino
- 19) Testicolo
- 20) Fegato
- 21) 4-16 cellule
- 22) Bud
- 23) Shield
- 24) 75%epibolia
- 14) 48 hpf
- 15) 5 giorni

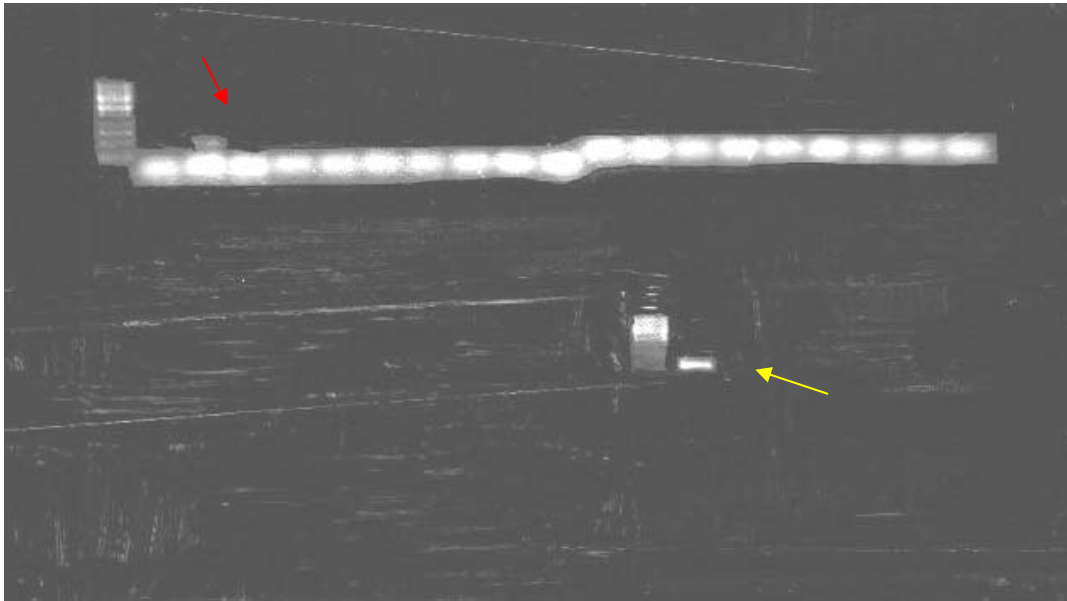
- 16) 3 settimane
- 17) 1 mese
- 18) 2 mesi maschio
- 19) 1+1/2 mese
- 20) 2 mesi femmina
- 21) ovario



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 14 15 16 17 18 19 20 21

Foto 2 a: RT-PCR di EF- α 1

1kb 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 14 15 16 17 18 19 20



1kb 21

Foto 2 b: RT-PCR

Il cDNA è presente in maniera molto evidente sia allo stadio di 24hpf(foto 3b-freccia gialla) che nell'ovario (foto 3b- freccia rossa); quest'ultimo risultato ci suggerisce che *soula* possa trattarsi di un gene di origine materna, essendo il trascritto particolarmente abbondante nell'ovario e anche allo stadio di 24hpf.

Il risultato negativo di tutti gli altri stadi embrionali e in altri tessuti ci può far presupporre sia che quantità di RNA totale estratto è stata esigua e quindi la retro-trascrizione ha dato un cDNA poco concentrato, tale da poter essere apprezzato

facilmente, sia che effettivamente il trascritto di *soulA* è assente in quegli stadi di sviluppo embrionale e quei tessuti dello zebrafish.

Espressione spaziale di *soulA*

Il profilo di espressione spaziale di *soul A* è stato studiato su embrioni interi *D.rerio* a vari stadi di sviluppo e su ovario di adulto, mediante la tecnica dell'ibridazione *in situ* “whole mount”, utilizzando come sonda l'RNA antisenso marcato con Digossigenina (Dig11-UTP) corrispondente all'inserito di cDNA del gene di interesse. L'RNA sintetico antisenso è lunga circa 700pb, misura compatibile con una buona efficienza di ibridazione.

L'in situ su sezioni di ovario ha rilevato che il trascritto è presente sicuramente nell'ovario (Foto 5a1-a2) come ci si aspettava dai risultati della RT-PCR; in particolare è presente in tutti gli stadi di differenziamento degli ovociti, da quelli più immaturi (OI), dove il segnale è più forte e omogeneamente distribuito nell'ooplasma, a quelli più maturi, nei quali un debole segnale è ancora visibile alla periferia cellulare in associazione con la membrana (MC). Che probabilmente si tratti di una proteina di membrana ci è avvalorato anche dal profilo idrofobico /idrofilico di *soulA* tipico di una proteina di membrana. (alternanza di idrofobicità e idrofilicità) (Foto 6). Le linee gialle del grafico rappresentano le porzioni idrofobiche mentre quelle in viola quelle idrofiliche;

soulA

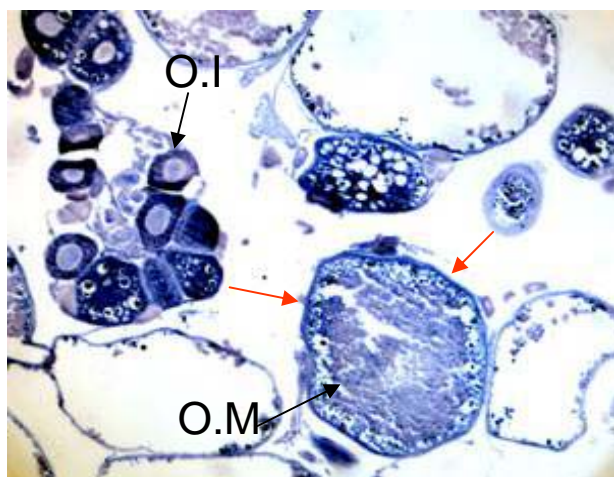


Foto 3a1: ISH su ovario di *D.rerio* (40x)

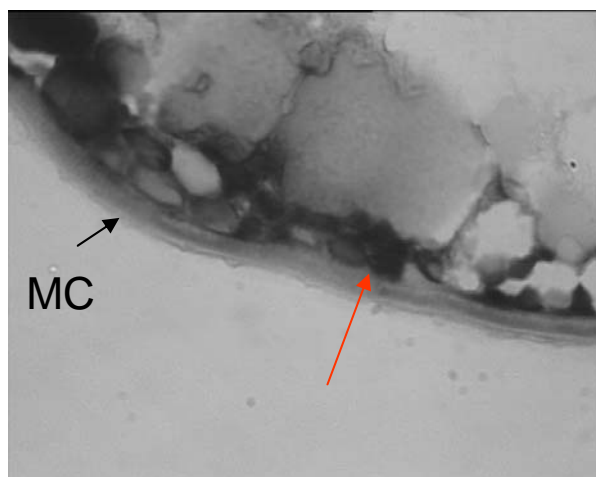


Foto 3a2: ISH su ovario di *D.rerio*

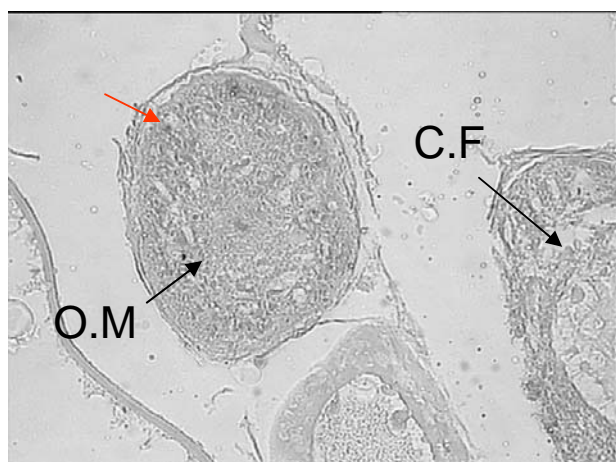


Foto 3 b1: ISH su ovario di *D.rerio* (40x)

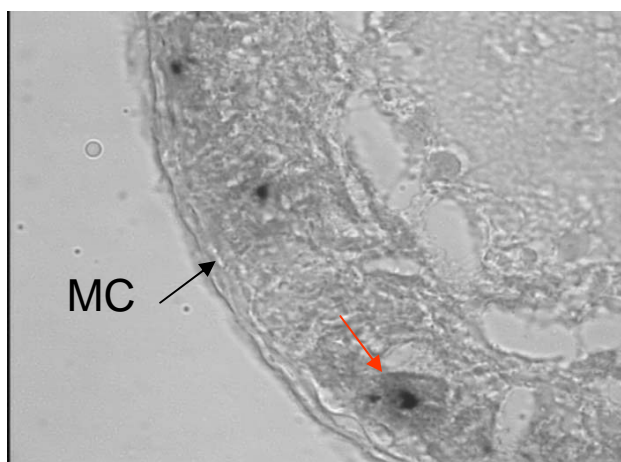


Foto 3 b2: ISH su ovario di 100x

soulB

Foto 3 : ISH di *soul A* e *soul B* su sezioni di ovario di D. rerio; **OI:** ovocita immaturo, **OM:** ovocita maturo, **MC:** membrana cellulare, **CF:** cellula follicolare

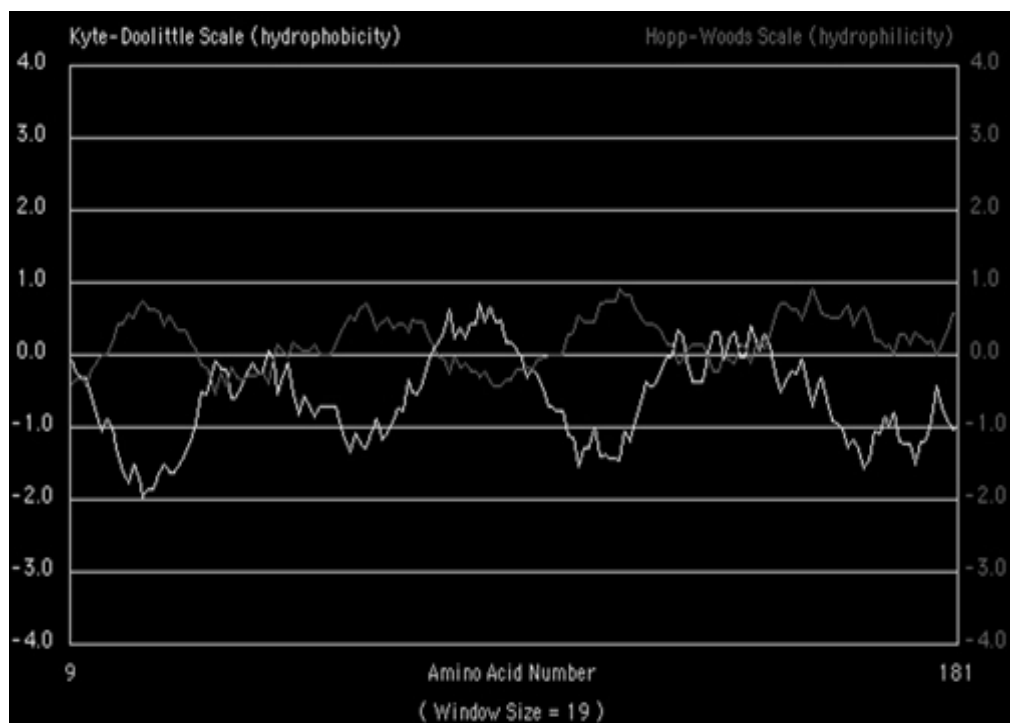
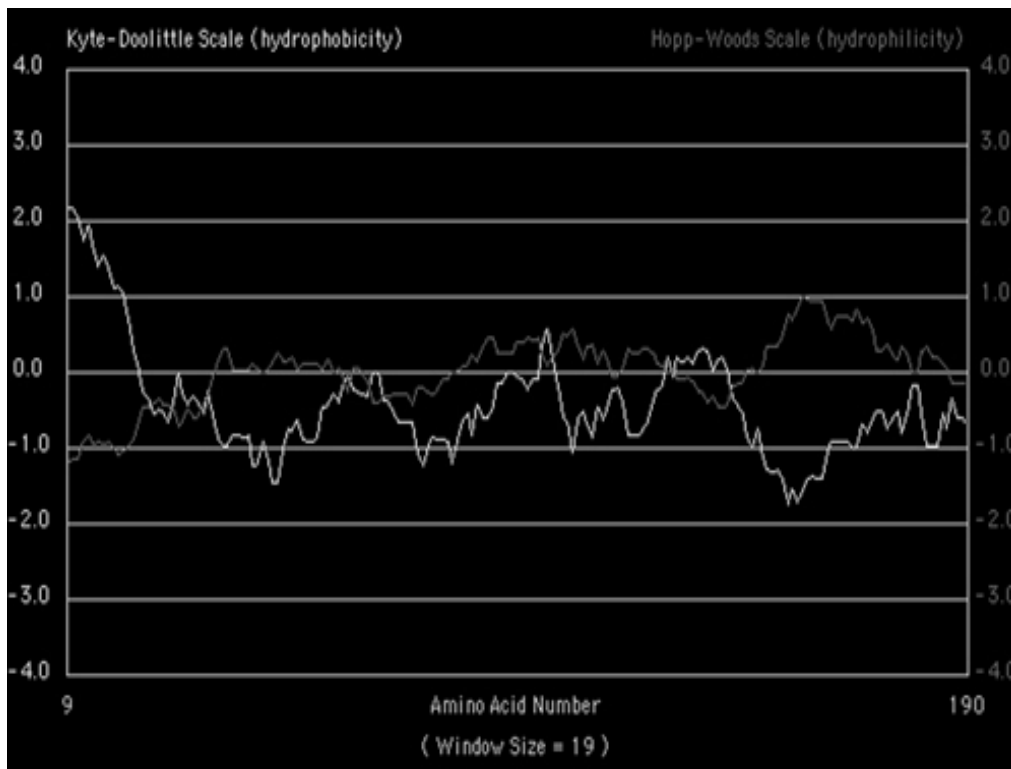


Fig 19:: profilo idrofobico/idrofilico ,in alto *soul A* in basso *soul B*



Soffermanci sull'espressione di *soul A* durante lo sviluppo embrionale, è emerso che il trascritto è presente nei primissimi stadi di sviluppo: l'mRNA endogeno è distribuito in tutti i blastomeri sin dalle prime divisioni cellulari, pur con un'evidente restrizione verso il setto divisorio tra vitello e cellule in divisione (sincizio del vitello) (foto 7). Nella periodo della gastrulazione, il segnale scompare dalle cellule del polo animale, mentre permane al margine della gastrula, nel territorio meso endotermico posto nella regione equatoriale, per poi restringersi andando a marcare il futuro margine dorsale in corrispondenza dello shield, o organizer, e le estremità anteriori e posteriori dell'embrione. Seguendo un percorso di localizzazione ben definito. Durante la somitogenesi il segnale è localizzato al sincizio del vitello, dove a 25 somiti diventa evidente nei pressi del margine posteriore. Nella foto 7 f è riportata una sezione di un embrione a 25 somiti dove è evidente la marcatura del segnale di *soulA* nel territorio sinciziale. Allo stadio di 24hpf, è evidente nella regione rostrale e caudale del tronco, un'espressione diffusa di *soulA*, cioè nei somiti appena formati e nella testa (foto X h). A questo stadio di

sviluppo, appare un'ulteriore nuovo dominio di trascrizione relativo alle cellule del sangue nella porzione anteriore e ventrale del vitello.

Espressione spaziale di *soulB*

Così come *soulA*, anche per *soulB* è stata trascritta una sonda antisenso sintetica marcata con digossigenina lunga circa 800bp.

L'espressione del trascritto rivelataci dalla ISH su ovario, ha mostrato un segnale diffuso uniformemente nell'ooplasma degli ovociti immaturi, in ovociti maturi, invece, il segnale è circoscritto in prossimità della membrana cellulare. Dal profilo di idrofobicità e idrofilicità della proteina (foto 6) si evince un marcato tratto idrofobico nella zona amminoternale, segno di un eventuale contatto fisico con la membrana cellulare.(foto 5b1.b2)

Durante lo sviluppo embrionale, *soulB* mostra una molteplice espressione riguardante diversi territori citologici ed embrionali. La prima evidenza di trascritti di *soulB* avviene nella zona antero-ventrale del vitello allo stadio di 24hpf; tale zona marca le cellule ematopoietiche

Una successiva localizzazione di territori embrionali marcati, risiede nella porzione posteriore della estensione del vitello e nel mesoderma caudale del tronco, nei territori somitici più recenti. Durante la maturazione dei somiti il segnale di *soulB* prima si inattiva dorsalmente e poi scompare.

Un ulteriore dominio di espressione di *soulB* risiede nei dotti pronefrici del rene embrionale, dove un iniziale segnale presente nella porzione terminale, nella regione della cloaca, si estende anteriormente con procedere dello sviluppo embrionale., fino a raggiungere l'estremità anteriore del rene embrionale a 72hpf.

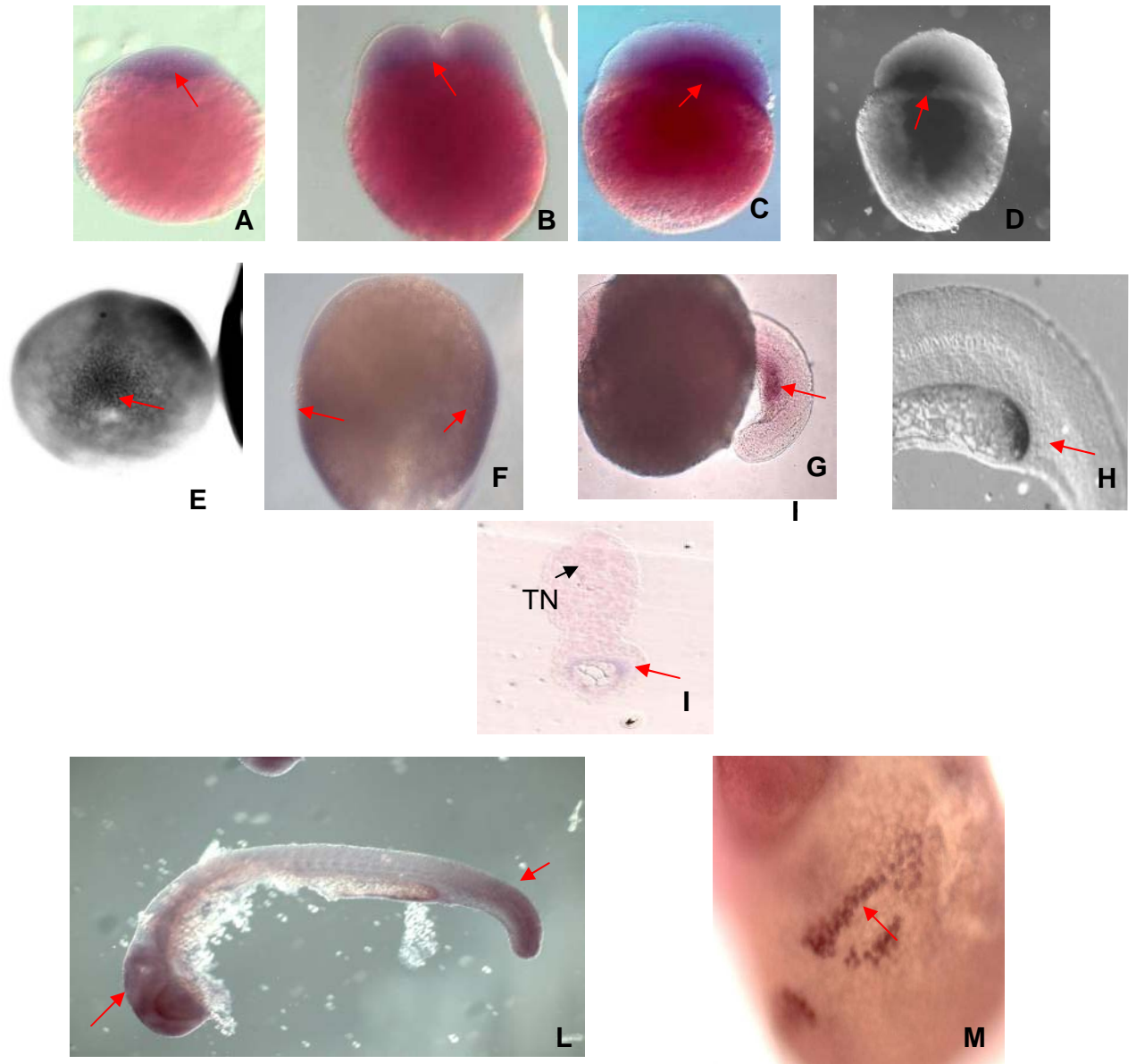


Foto 4: ISH di *soulA* in embrioni di *D. rerio* wt; A-B: segmentazione, C-D-E-F :gastrulazione, F-G-H-I- L-M somitogenesi

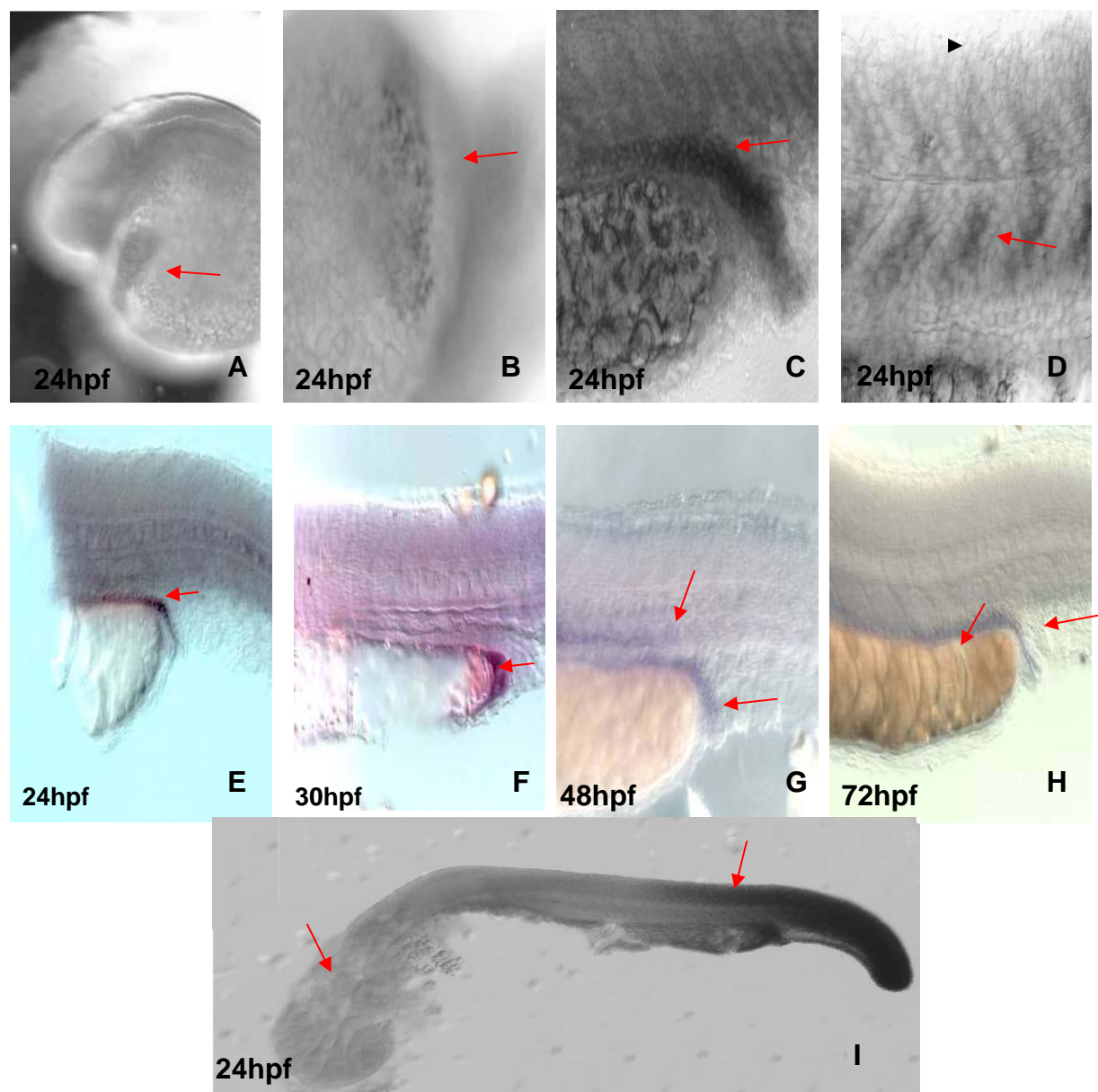
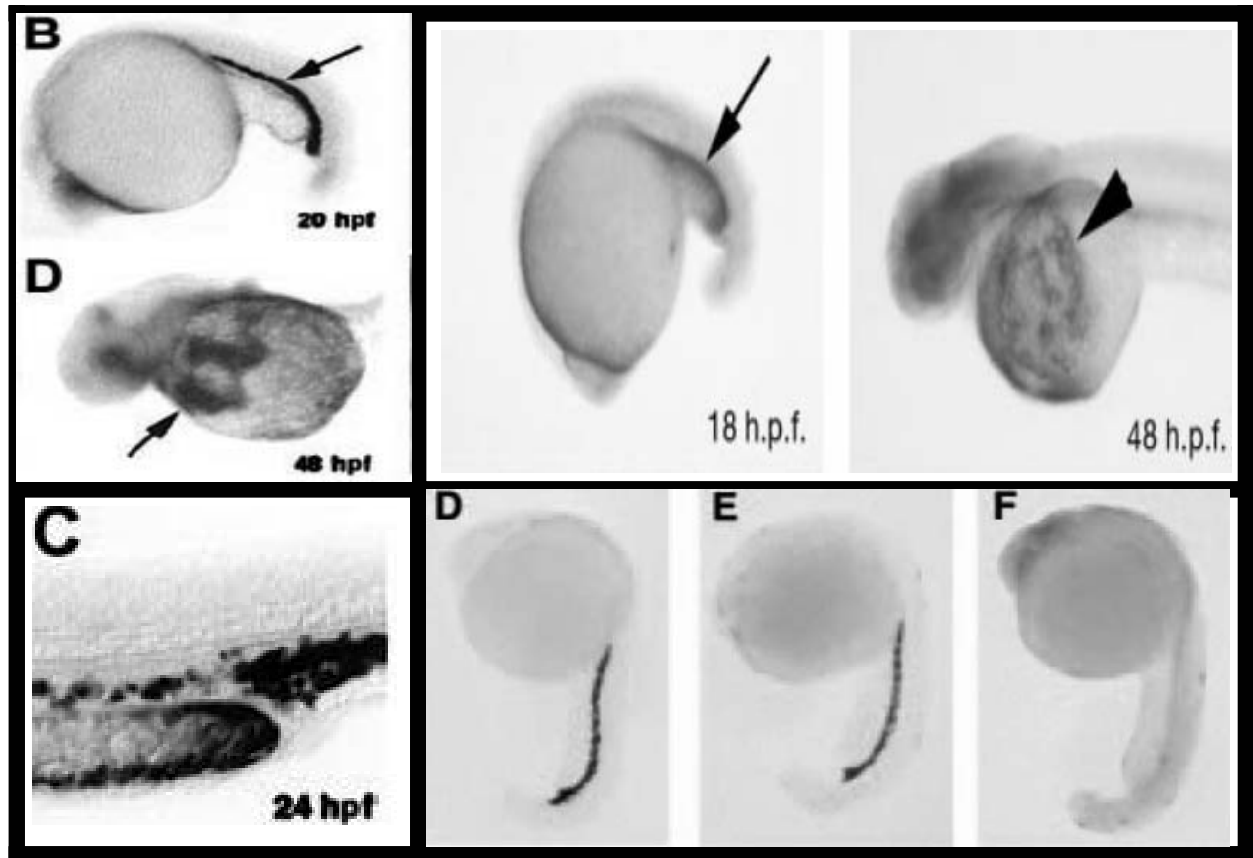


Foto 5: ISH di *soulB* in embrioni di *D. rerio* wt; A-B cellule del sangue C-E-F-G-H dotti Pronefrici, D somiti,, I somiti giovani

DMT1

ferroportina 1



TFR1



alas1

abat1

Foto 6: espressione dei geni *DMT1*, *ferroportina 1* e *TFR1* su wt

Microiniezione di oligonucleotidi antisenso Morpholino (MO).

Le microiniezioni sono state eseguite su uova di *D. rerio* appena fecondate facendo accoppiare maschi e femmine seguendo un rapporto 1:2. Le diluizioni di morfolino testate sono state di 1mM, 5mM e 10mM con il 0,5% di rosso fenolo come tracciante; le soluzioni sono state microiniettate nel citoplasma del singolo blastomero calibrando il volume della soluzione pari a circa $\frac{1}{20}$ del volume dell'uovo fecondato onde evitare di danneggiare la cellula, o nel vitello. Una volta microiniettate, le uova sono state incubate e lasciate svilupparsi fino allo stadio 72hpf monitorando il corretto sviluppo embrionale. Successivamente al fine di studiare l'effetto della inattivazione della sintesi proteica dei geni *soul/hbp* sulla produzione di emoglobina per la maturazione eritrocitaria, a partire dalle 24hpf, 48hpf e 72hpf, gli embrioni sono stati esposti alla o-dianisidina, che agisce sulla emoglobina degli eritrociti colorandola di rosso scuro al fine di poter rilevare la quantità di emoglobina prodotta. Per *soulA* la concentrazione funzionale di morfolino che ha generato risultati più convincenti e riproducibili è stata 10mM; per *soulB* un effetto rilevante si è ottenuto con una concentrazione 5mM.

Come ipotizzato la colorazione risultata molto attenuata sui moranti per entrambi i geni *soul/hbp* rispetto ai controlli. (foto 7 a-b) Col procedere dello sviluppo embrionale l'attenuazione della colorazione della emoglobina sui moranti appare sempre più netta rispetto ai controlli in conseguenza dell'aumento del numero degli eritrociti che generano una sempre più marcata colorazione nei controlli.

Tuttavia l'effetto del morfolino di *soulA* appare più marcato di quello di *soulB*

Un particolare interesse è rivolto verso *soulB* in quanto l'effetto del morfolino indurrebbe non solo la mancata marcatura della emoglobina, ma anche uno sviluppo anomalo della coda e del vitello.(foto7b E)

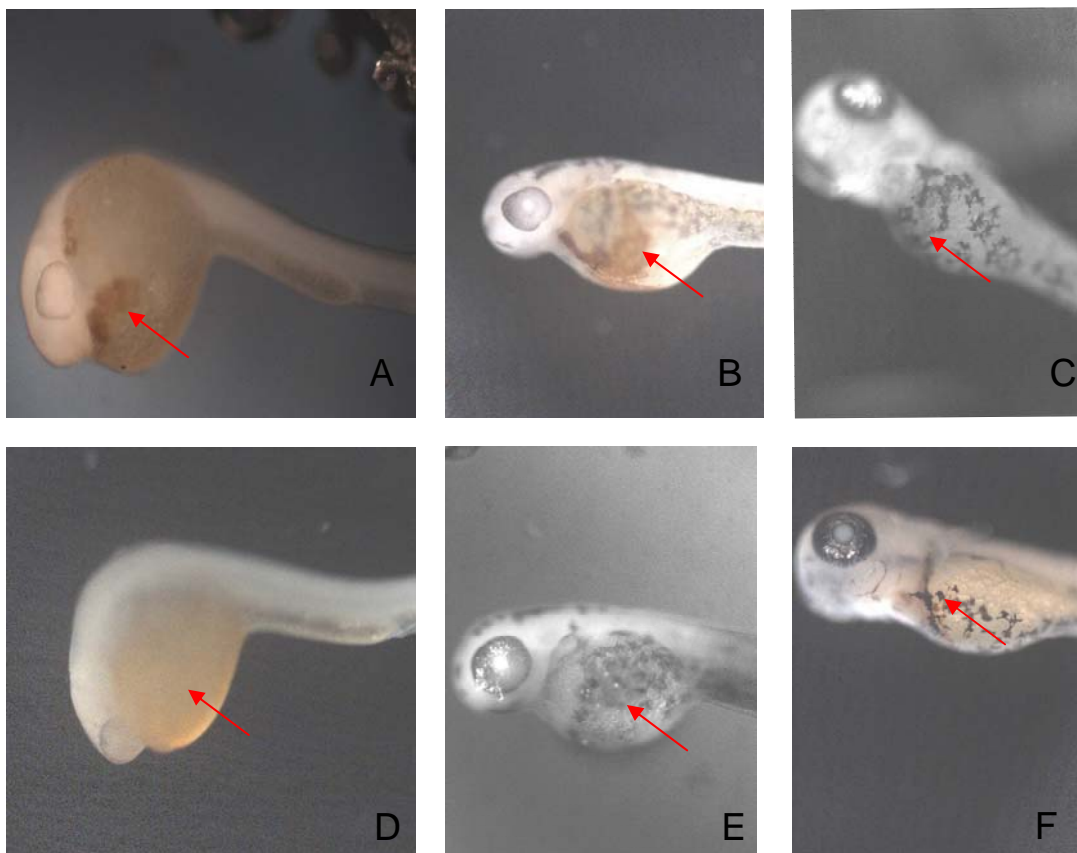


Foto 7 a: embrioni microiniettati con morfolino di *soulA* colorati con o-dianisidina 10mM

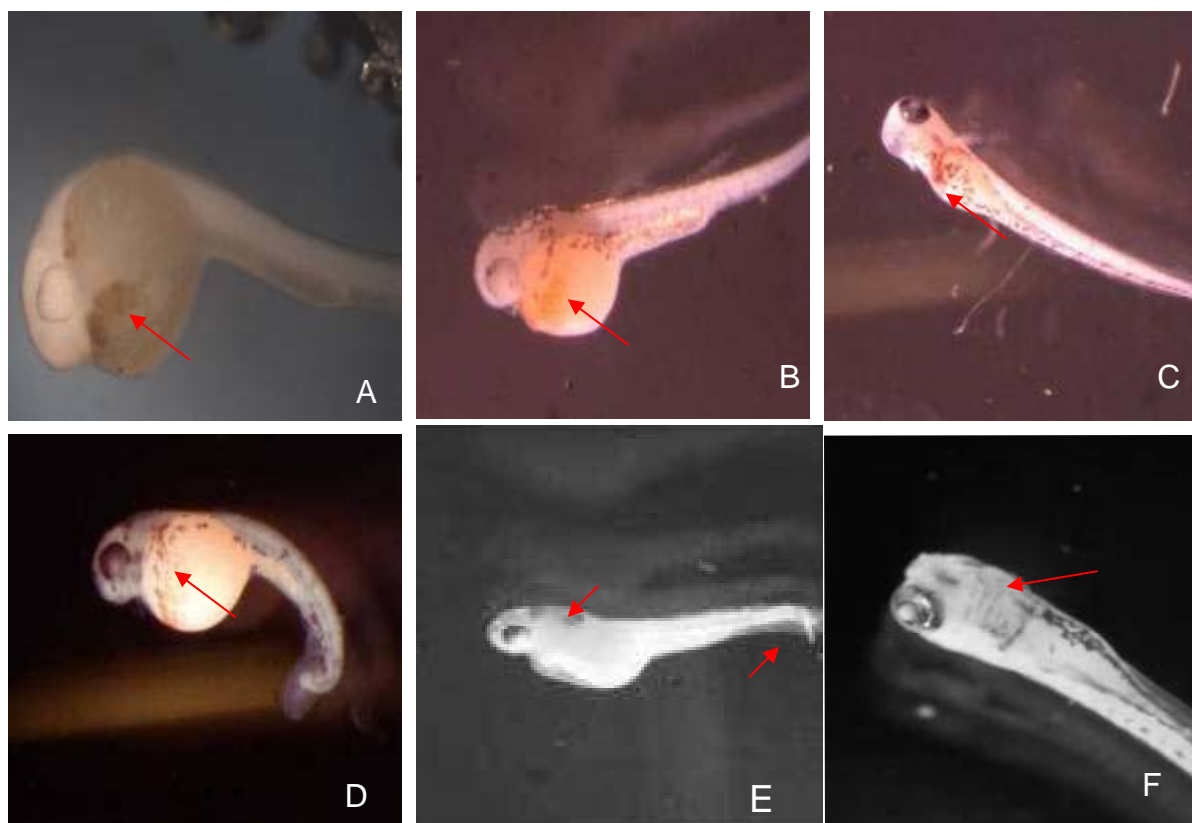


Foto 7 b: embrioni microiniettati con morfolino di *soulB* colorati con o-dianisidina 5mM

ISH di *soul/hbp* su embrioni mutanti di geni eritrogenetici.

Lo studio in epistasi per individuare la presenza di eventuali interazioni regolative e funzionali tra i geni *soul/hbp* oggetto di questo studio, ed altri geni eritrogenetici, ci ha portato alla ricerca di embrioni di zebrafish recanti mutazioni di interesse per i nostri scopi. Sono stati utilizzati embrioni di *Danio rerio* portatori di alleli mutanti di geni implicati nella ematopoiesi quali *chardonnay* (*cdy*) portatore di un allele mutante del gene *DMT1* il cui gene codifica per la proteina Divalent- Metal - Transporter (50) che ha il compito di trasportare il ferro libero dall'endosoma al citosol; *weissherbest* (*weh*) portatore di un allele mutante del gene della *ferroportina 1*, (49) che regola l'internalizzazione del ferro nei globuli rossi, e *chianti* (*cia*), portatore di un allele mutante del gene *TFR1*, gene codificante per il recettore della Transferrina (51) col ruolo di incorporare il ferro mediante endocitosi, all'interno della cellula. Nella foto z si nota l'espressione spaziotemporale dei geni presi in considerazione per il nostro lavoro. Si può osservare il segnale nelle cellule del sangue sia nel vitello (*DMT1 ferroportina 1*) che nel tronco (*DMT1, ferroportina 1 e TFR1*)

Questi mutanti sono stati sottoposti alla ibridazione in situ sia con *soul A* che con *soul B*, per valutarne le eventuali interazioni regolative e funzionali tra i geni *soul/hbp* e quelli mutati. Gli stadi di sviluppo presi in esame sono stati 25 somiti e 24 hpf, idonei per l'osservazione delle cellule del sangue e le in situ delle *soul/hbp*. Dalla ISH di *soul A* su *cdy*, emerge che rispetto ai selvatici (*wt*) hanno la loro espressione normale nel vitello, estensione inclusa, (Foto 12) L'espressione di *soulB* invece è presente nel vitello, ma quella nei dotti pronefrici appare molto debole.

Un risultato interessante emerge dall'analisi del mutante *chianti*, dove sia *soulA* che *soulB* non hanno espressione né nel sangue, né nel rene (foto13)

Il gene della *ferroportina 1* sembra non avere nessuna relazione con *soul/hbp* in quanto il loro segnale rimane conservato nei mutanti.

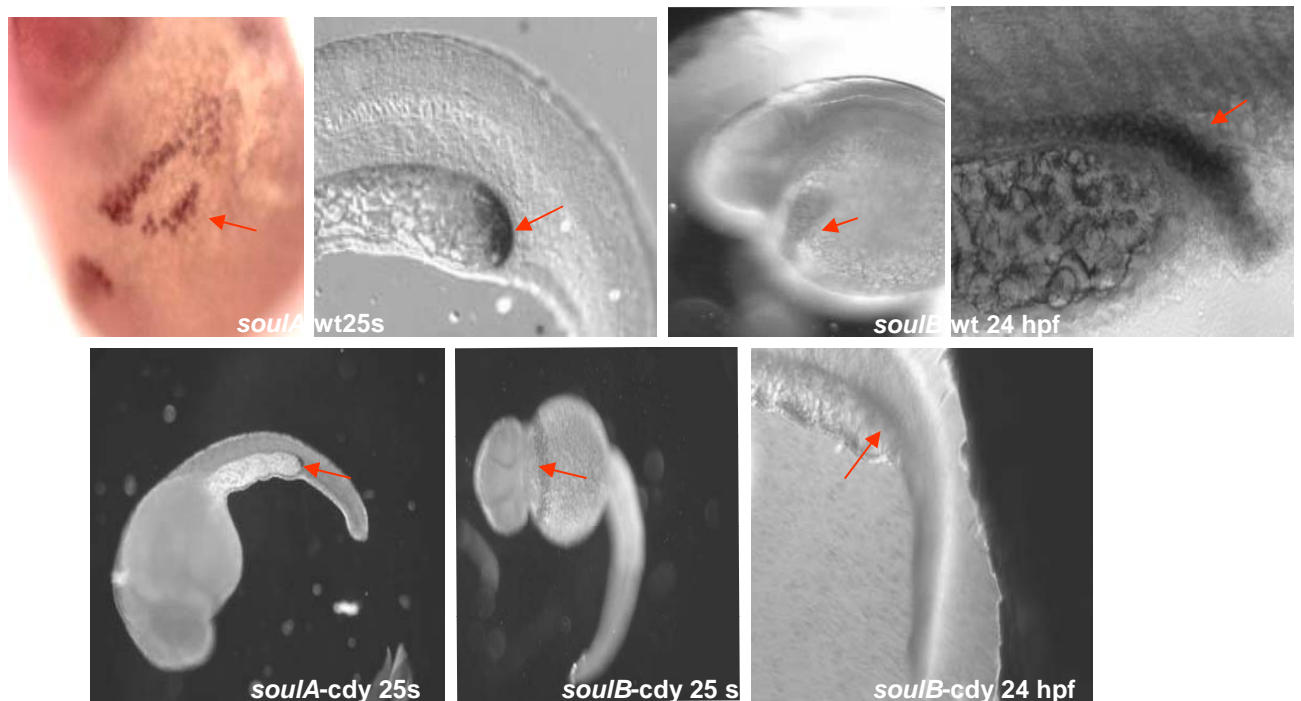


Foto 8 :relazione epistatica tra i geni *soul/hbp* e *DMT1*

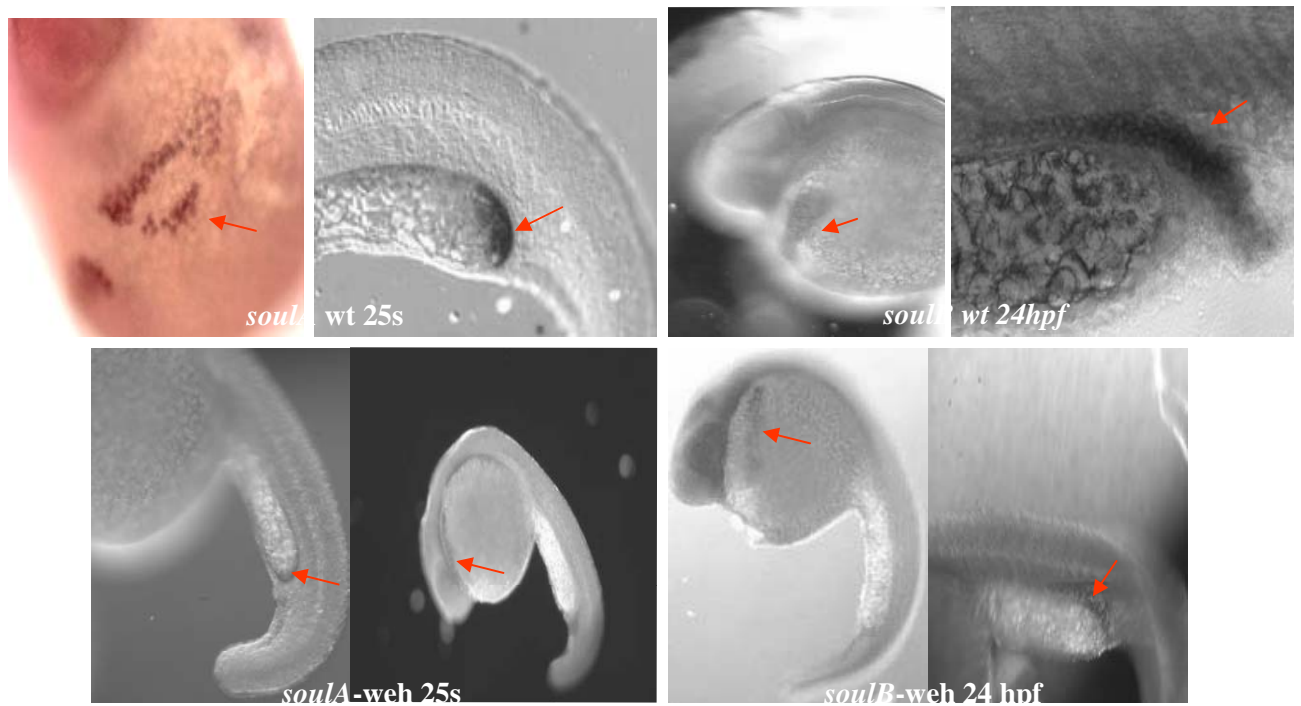


Foto9 :relazione epistatica tra i geni *soul/hbp* e *ferroportina 1*

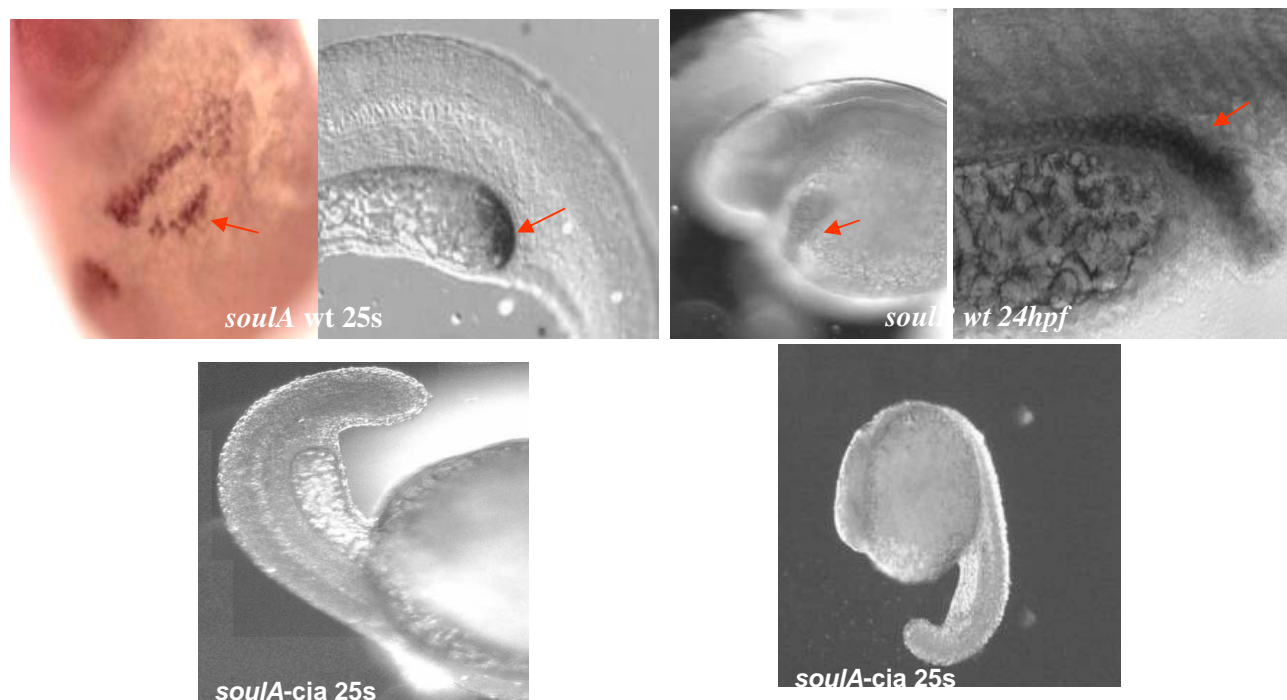


Foto10 :relazione epistatica tra i geni *soul/hbp* e *TFR1*

DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo studiato i geni *soul/heme binding protein* (*soul/hbp*) nel sistema modello *Danio rerio*, comunemente noto come zebrafish, scelti per il loro ruolo nel metabolismo del ferro. In particolare, viene descritto il clonaggio e la caratterizzazione strutturale e funzionale dei due ortologi *soulA* e *soulB* in *D.rerio*.

Le proteine Heme Binding Protein/Soul

Le *heme binding protein* appartengono ad una famiglia poco conosciuta, il cui ruolo durante lo sviluppo embrionale non è ancora stato definitivamente chiarito. Originariamente, nel 1998, Taketani et al descrissero il gene *p22HBP*, una heme binding protein che venne studiata dal punto di vista enzimatico in colture cellulari (48). Nel corso di questa indagine, si è visto che la proteina p22HBP esercita il proprio ruolo nel metabolismo del ferro di diverse tipologie di organi e cellule, e in particolare nella sintesi dell'emoglobina durante il differenziamento degli eritrociti. p22HBP contiene un dominio idrofobico di dieci aminoacidi in posizione 73-82. Nel 1999, Zylka e Reppert individuano e caratterizzano biochimicamente l'omologo di pollo di p22HBP, al quale attribuiscono il nome di *soul* (53).

Facendo una ricerca degli omologi dei geni *soul* disponibili presso database di sequenze nucleotidiche e amminoacidiche, è emerso che questa proteina è presente in tutti gli organismi viventi, quindi batteri, piante e animali, dai cordati primitivi fino all'uomo (vedi schema).

Dal confronto tra i membri della famiglia, è emerso che il dominio idrofobico è principalmente caratterizzato dalla presenza di due coppie di amminoacidi altamente conservate, ovvero metionina e treonina in posizione 78 e 79, e prolina e valina in posizione 81 e 82 (52).

I geni *soul/hbp* di zebrafish

Al fine di isolare i geni *soul/hbp* presenti nel genoma di *D. rerio*, abbiamo inizialmente consultato varie banche dati, incluso il portale del sequenziamento del genoma e quelli di differenti progetti di sequenziamento di EST, potendo così individuare due presunti membri della famiglia in questione. Tali geni sono stati in seguito concretamente ottenuti sotto forma di un clone EST proveniente da una società con sede in Berlino, e tramite amplificazione di cDNA utilizzando primers specifici sviluppati sulla sequenza precedentemente ricavata. Il sequenziamento dei cloni così ottenuti ha permesso di ricostruire la struttura nucleotidica dell'intera sequenza codificante, sì da poter confrontare la proteina dedotta con tutte le proteine SOUL/HBP disponibili. In conclusione, quest'ultima analisi ha confermato l'appartenenza dei due geni di zebrafish da noi isolati alla famiglia dei geni *soul/hbp*, come testimoniato dalla presenza del dominio idrofobico di Taketani et al. (52). In assenza di una chiara strategia nomenclaturale riguardante questa famiglia, per i quali geni i vari autori o database utilizzano nomi diversi, quali per esempio *soul*, placental protein 23, p22HBP, HEBP1 o HEBP2, abbiamo scelto di utilizzare una soluzione parsimoniosa, in attesa di successivi approfondimenti. Pertanto, i geni di zebrafish sono stati qui denominati *soulA* e *soulB*. Dall'allineamento tra i vari geni *soul/hbp* è possibile riconoscere, al di là della regione idrofobia, l'elevata conservazione di singoli residui, o di brevi

sequenze, come all'estremità carbossiterminale (52). Visualizzati mediante il software LOGO (Fig.XX), tali residui conservati possono essere ascritti, in via ipotetica, ad uno specifico valore funzionale e/o strutturale. In particolare, è interessante sottolineare la presenza di diverse proline comuni a tutti i membri della famiglia, e di un tetrapeptide posto all'estremità 3' (NEVW). Lo studio della filogenesi molecolare dei geni *soul/heme binding protein* ha non solo suffragato quanto appena affermato, riguardo l'identità *soul/hbp* dei geni da noi isolati in *D. rerio*, ma ha altresì permesso di distinguere l'esistenza di diversi raggruppamenti, o sottoraggruppamenti, sia dal punto di vista strutturale che filogenetico. In particolare, il programma di filogenesi Neighbour-Joining distingue tre principali cladi filogenetici, il primo caratterizzato da geni di batteri e piante, il secondo contenente sequenze distribuite lungo l'intero arco sistematico incluso nella nostra analisi, ad eccezione dei batteri, ed il terzo apparentemente specifico dei Cordati. Questo risultato è fortemente suggestivo del fatto che un singolo gene *soul/hbp*, presente in tutti gli organismi viventi, si sia duplicato all'origine dei Cordati (foto 17). Inoltre, è possibile distinguere due principali sottocladi all'interno del secondo raggruppamento, presumibilmente corrispondenti a sottofamiglie. Queste osservazioni naturalmente sono preliminari e richiederanno studi dedicati onde risolvere l'evoluzione molecolare della famiglia oggetto di questo studio.

Dal lavoro di Taketani (52) è evidente la presenza di un sito poliadenilico (NSLFGSVETW) all'estremità amino terminale ritenuto dagli autori responsabile della solubilità della proteina. L'assenza di tale sequenza amminoacidica nei due geni *soul* di *D. rerio* presumibilmente denota il fatto che *soulA* e *soulB* non siano proteine citosoliche (così come mostrato da Taketani e colleghi in colture cellulare di topo) (foto citosol topo). E' interessante notare che questa osservazione sembra coincidere con il profilo idrofobico e idrofilico delle due proteine, che mostra un andamento tipico delle proteine di membrana (Foto 6).

Espressione spazio/ temporale di SOUL A e SOUL B

Il passo successivo è stato quello di studiare l'attività trascrizionale dei due orologi *soulA* e *soulB* durante lo sviluppo embrionale di zebrafish, onde poter acquisire informazioni relative all'attività di questi geni durante lo sviluppo dei vertebrati. Per far questo, abbiamo clonato il cDNA di *soulA* nel vettore di espressione *pBluescript* KS II- vector (Stratagene) (Fig 10). Altrettanto è stato fatto per *soulB*, il cui prodotto PCR è stato clonato nel vettore di espressione TOPO-TA pCR-2.1 (Invitrogen). Successivamente abbiamo creato delle ribosonde marcate con digossigenina per studiare l'espressione spazio/temporale in embrioni di *D.rerio* mediante ibridazione in situ "whole mount"(ISH). L'analisi trascrizionale ha evidenziato una netta correlazione spazio-temporale nell'attività dei due geni *soul/hbp* di zebrafish, i quali presumibilmente condividono diverse funzioni, mentre si distinguono per altre.

Espressione di *soulA* durante oogenesi e ontogenesi di zebrafish

La sonda antisenso di messaggero sintetico di *soulA* marcato con digossigenina è lunga circa 700bp, misura compatibile con una buona efficienza di ibridazione specifica. Come primo test di efficacia della sonda, abbiamo realizzato un esperimento di ISH su ovario di adulto, riscontrando la presenza di questo messaggero in tutti gli stadi di differenziamento degli ovociti, da quelli più immaturi dove il segnale è più forte e omogeneamente distribuito nell'ooplasma, a quelli più maturi, nei quali un debole segnale è ancora visibile alla periferia

cellulare, in associazione con la membrana (foto 3 a1-a2). Il profilo di idrofilicità e idrofobicità della proteina dedotta avvalora l'ipotesi che *soulA* possa svolgere il ruolo di proteina di membrana (fig 19). Durante lo sviluppo embrionale, l'mRNA endogeno è distribuito in tutti i blastomeri sin dalle prime divisioni cellulari, pur con una evidente retrizione verso il setto divisorio tra vitello e cellule in divisione (sincizio del vitello) (foto 4a-b-c-d). Durante la gastrulazione, il segnale scompare dalle cellule del polo animale, mentre permane al margine della gastrula, nel territorio meso-endodermico posto nella regione equatoriale, (foto 4e) per poi successivamente restringersi andando a marcare il futuro margine dorsale, in corrispondenza dello shield, o organizer, e le estremità anteriore e posteriore dell'embrione (foto 4f), seguendo un percorso di localizzazione ben definito. Durante la somitogenesi, il segnale è circoscritto al sincizio dell'estensione del vitello (foto 4g), laddove la marcatura si restringe progressivamente verso il margine posteriore intorno ai 25 somiti di sviluppo (foto 4h) Nella foto 4l è riportata l'immagine di una sezione di embrione a 25 somiti dove si vede chiaramente il segnale di *soulA* nel territorio sinciziale. Allo stadio di 24hpf, un'espressione diffusa di *soulA* è evidente nella regione rostrale e caudale del tronco, cioè nei somiti appena formati e nella testa (foto 4L). A questo stadio di sviluppo, appare un'ulteriore nuovo dominio di trascrizione relativo alle cellule del sangue nella porzione anteriore e ventrale del vitello. (foto 4M) Al fine di meglio definire l'istologia e i tipi cellulari nei domini di espressione, abbiamo ricercato in letteratura altri geni di zebrafish con espressione simile a quella di *soulA*. Nella foto Y(55) sono riportati alcuni geni coinvolti nel differenziamento del sangue, i quali mostrano patterns evocativi di *soulA*. Per esempio, l'espressione nel sincizio dell'estensione del vitello corrisponde ai territori marcati dalla *ferroportina 1 1 11* (*fpt1*), gene coinvolto nel metabolismo del ferro durante il differenziamento del sangue. Analoga osservazione vale per i geni *transferrina* e *intestinal fatty acid binding protein* (*ifabp*), la cui funzione serve per il differenziamento dei maggiori

organi endodermali. Viceversa, l'espressione di *soulA* in cellule del sangue è suffragata dal confronto con l'attività di geni cruciali per l'eritropoiesi, quali *alas2*, *divalent metal transporter 1 (dmt1)* e *fpt1* espressi al margine anteriore del vitello (foto k).

Attività trascrizionale di *soulB* durante oogenesi ed ontogenesi, e confronto con *soulA*.

Anche per *soulB* l'efficacia della sonda antisenso, di circa 800pb, è stata testata in ovario di zebrafish adulto. Il segnale è debole e appare diffuso uniformemente nell'ooplasma degli ovociti più immaturi; in ovociti maturi invece, il segnale è in prossimità della membrana cellulare, analogamente a quanto abbiamo già avuto modo di osservare nel caso di *soulA*. E infatti, anche in questo caso la proteina codificata presenta una marcata idrofobicità dell'estremità amminoterminale, offrendo spunto per ipotizzare un eventuale contatto fisico con la membrana cellulare (fig19).

Analizzando l'espressione spazio temporale di *soulB* durante lo sviluppo embrionale,

il trascritto mostra una molteplice espressione riguardante diversi territori citologici ed embrionali, che in parte coincidono con quelli di *soulA*. A proposito di questi ultimi aspetti condivisi, la prima evidenza di trascritti di *soulB* avviene nella zona antero-ventrale del vitello (foto 5 a-b), dove l'espressione è concentrata nelle cellule ematopoietiche. Va detto che il segnale di *soulA* risulta però meno intenso. Altra regione di co-espressione dei due orologi è evidente nella porzione posteriore dell'estensione del vitello. Infine, entrambi gli orologi sono trascritto nella mesoderma caudale del tronco, nei territori somitici più recenti.(foto 5 I) Durante la maturazione dei somiti (lungo l'asse postero-anteriore del tronco), il segnale di *soulB* prima si inattiva dorsalmente, e poi scompare del tutto. Viceversa, due principali motivi distinguono *soulA* e *soulB*:

- a) il gene *soulB* presenta un dominio di espressione nei dotti pronefrici del rene embrionale,(foto 5 C) dove un iniziale segnale circoscritto alla porzione terminale, nella regione cloacale, si estende anteriormente col procedere dello sviluppo embrionale,(foto 5 E) fino a raggiungere l'estremità anteriore del rene embrionale a 72hpf (foto F-G-H);
- b) *soulB* non è mai espresso nella testa durante tutto lo sviluppo embrionale.(foto5 I)

Anche per *soulB* si è consultata la letteratura alla ricerca di altri geni, con domini di espressione simili. Per quanto riguarda l'espressione in cellule del sangue vale quanto detto per *soulA* nel paragrafo precedente riguardo l'implicazione dei geni *soul/hbp* nell'ematopoiesi, come suggerito dal confronto con la funzione di geni quali *alas2*, *divalent metal transporter 1 (dmt1)* e *fpt1*, attivi nelle cellule del sangue al margine anteriore del vitello (foto 6). E' interessante osservare che le cellule del sangue e i dotti pronefrici sono in stretta relazione (58) in quanto, in zebrafish, il rene è un organo ematopoietico (54). Per esempio, i geni *alas1* e *alas2* (5-aminolevulinato sintasi) (foto 6 a)controllano la produzione di emoglobina nel sangue e sono espressi in entrambi i territori (58) e dati provenienti dal database per domini di espressione ZFIN, www.zfin.org).

L'inibizione delle proteine SOUL/HBP provoca anomalie nel differenziamento del sangue, del tronco e del vitello.

Per studiare il ruolo fenotipico di *soulA* e *soulB*, abbiamo scelto di valutare le conseguenze della mancata funzione proteica inibendo l'attività trasduzionale mediante microiniezione di oligonucleotidi antisenso, detti morfolino. I morfolino (fig 14a), di lunghezza variabile tra 18 e 25 basi, sono complementari alla regione dell'ATG o dei siti di splicing della sequenza specifica del gene di interesse. La funzione principale è appunto quella di bloccare la traduzione del mRNA e quindi la sintesi della proteina (Fig 14b). Le microiniezioni con i morfolino sono state eseguite su uova fecondate allo stadio di 1-4 cellule.

Per individuare la concentrazione ideale per ciascun morfolino abbiamo analizzato diverse diluizioni in 1mM, 5mM e 10mM, utilizzando 0,5% rosso fenolo come tracciante. Le soluzioni sono state microiniettate nel citoplasma del singolo blastomero, calibrando il volume della soluzione pari a circa 1/20 del volume dell'uovo fecondato onde evitare di danneggiare la cellula, oppure nel vitello.

Dopo la microiniezione, gli embrioni sono stati incubati a 28°C e lasciati sviluppare fino a 72hpf, monitorando l'eventuale insorgenza di anomalie macroscopiche del normale sviluppo embrionale. Al fine di indagare l'effetto dell'inattivazione della sintesi proteica dei geni *soul/hbp* sulla produzione di emoglobina, e quindi di maturazione degli eritrociti, a partire da 24 hpf, periodo questo dove le cellule del sangue hanno raggiunto uno stadio avanzato di differenziamento, e proseguendo con lo stadio di 48hpf e 72hpf, gli embrioni sono stati esposti alla o-dianisidina, sostanza che colora l'emoglobina dei globuli rossi, così da poter rilevare la quantità di emoglobina prodotta. Per *soulA* la concentrazione funzionale di morfolino che ha generato i risultati più convincenti e riproducibili è stata 10mM; per *soulB*, un effetto netto si è rilevato con una concentrazione di 5mM.

Come ipotizzato, la colorazione dell'emoglobina è risultata molto attenuata negli embrioni morfolinati per entrambi i geni *soul/hbp* rispetto ai controlli. Col procedere dello sviluppo embrionale l'attenuazione della colorazione è sempre più evidente (foto10-11) in conseguenza dell'aumento del numero degli eritrociti, che generano una sempre più marcata colorazione nei controlli (a 72hpf raggiunge la completezza). Tuttavia, l'effetto del morfolino per *soulA* sulla sintesi di emoglobina appare più severo del morfolino per *soulB*. Inoltre, rispetto a *soulB*, la perdita della funzione di SOULA provoca anche un ridotto sviluppo del vitello.

Un particolare interesse è rivolto verso *soulB* in quanto l'effetto del morfolino non solo provoca una diminuzione nella marcatura dell'emoglobina, ma anche uno sviluppo anomalo della parte caudale dell'embrione (foto11); questo risultato potrebbe essere dovuto ad un ipotetico ruolo di *soulB* durante il differenziamento del tronco, come suggerito dall'espressione durante le prime fasi dello sviluppo dei somiti.

Relazione epistatica tra i geni *soul/hbp* e altri fattori ematopoietici

Il passo successivo del nostro lavoro è stato quello di studiare in epistasi la presenza di eventuali interazioni regolative e funzionali tra i geni *soul/hbp* oggetto di questo studio, ed altri geni eritrogenici. A tal fine sono stati utilizzati embrioni di *Danio rerio* portatori di alleli mutanti di geni implicati nella ematopoiesi. I mutanti di interesse per il nostro scopo sono stati *chardonnay* (*cdy*) portatore di un allele mutante del gene *DMT1* il cui gene codifica per la proteina Divalent- Metal - Transporter (50) che ha il compito di trasportare il ferro libero dall'endosoma al citosol; *weissherbest* (*weh*) portatore di un allele mutante del gene della Ferroportina 1 1 1 1, (49) che regola l'internalizzazione del ferro nei globuli rossi, e *chianti* (*cia*), portatore di un allele mutante del gene *TFR1*, gene codificante per il recettore della Transferrina (51) col ruolo di incorporare il ferro mediante

endocitosi, all'interno della cellula. Nella foto z si nota l'espressione spazio-temporale dei geni presi in considerazione per il nostro lavoro. Si può osservare il segnale nelle cellule del sangue sia nel vitello (*DMT1* e *Ferroportina 1 1 1*) che nel tronco (*DMT1*, *Ferroportina 1 1 1* e *TFR1*)

Questi mutanti ci sono stati forniti dal laboratorio del professore Leonard Zon, in Boston (studioso da anni della ematopoiesi e l'oncogenesi sia in zebrafish che in topo), presso il cui laboratorio, tra l'altro, abbiamo acquisito informazioni di carattere scientifico sia sui mutanti in questione, sia sulla gestione dell'allevamento di zebrafish.

In primo luogo la nostra attenzione è stata rivolta verso l'osservazione anatomo-morfologica dello sviluppo embrionale e soprattutto riguardante organi come il cuore e il rene, alterati morfogeneticamente nei suddetti mutanti. Tutti e tre questi mutanti mostrano, a partire dalle 24 hpf, sangue privo di colore, indice della presenza di emoglobina immatura o assente (anemia). Il nostro scopo è stato quello di utilizzare questi tre mutanti per studiare, attraverso l'espressione spazio-temporale di *soulA* e *soulB*, una eventuale correlazione. Gli stadi di sviluppo presi in esame sono stati 25 somiti e 24 hpf, idonei per l'osservazione delle cellule del sangue e le in situ di *soulA* e *soulB*. Quello che è emerso è che sia i mutanti di *DMT1*, che quelli della *ferroportina 1 1 1*, presentano un'espressione normale nel vitello, estensione inclusa, ciò significando che probabilmente non vi sia correlazione genetica con *DMT1*, pur lasciando aperta la possibilità che i geni *soul* siano implicate nel legame del ferro dai siti di deposito e di assorbimento al recettore (per la internalizzazione all'interno della cellula), e nel trasporto del ferro libero dall'endosoma al citosol; (foto fas)

Un aspetto interessante emerge dall'analisi del mutante *chianti*, dove sia *soulA* che *soulB* non si esprimono né nel vitello né nel sangue (foto f). Questo risultato dà sostegno all'ipotesi che la trascrizione dei geni *soul* necessiti di una proteina TFR1 funzionale, o altrimenti che il ferro trasportato da TFR1 agisca, direttamente o

indirettamente, sulla loro espressione. Inoltre, ciò potrebbe significare che *soulA* sia implicato nel meccanismo di azione del recettore della transferrina (TFR1), cioè come recettore che ingloba transferrina-ferro, per rilasciare il ferro al mitocondrio.

Per quel che riguarda l'espressione dell'ortologo *soulB*, sembrerebbe esserci una correlazione con la proteina DMT1, perché nonostante l'espressione nel vitello sia presente, quella nei dotti pronefrici è molto debole. La relazione invece sembra non esserci tra *soulB* e il gene della *ferroportina 1 1 1 1* in quanto il segnale di *soulB* sembra inalterato sia nel rene che nel sangue.

I dati fin qui acquisiti saranno ulteriormente verificati: altre ISH su questi mutanti sono attualmente in corso sia per confermare i dati supposti, sia per modificare il protocollo di ibridazione in situ.

CONCLUSIONI

Il nostro scopo è stato quello di cercare un gene che possa rappresentare un ipotetico QTL di interesse per l'acquacoltura.

Il gene *soul/ heme binding protein*, sembra un candidato ottimale per lo scopo prefissatoci. Il nostro studio ha permesso di illustrare aspetti salienti relativi alle funzioni dei due ortologi di zebrafish: *soulA* e *soulB*

Dal confronto delle sequenze amminoacidiche dei geni studiati con gli omologhi di topo (gruppo di Taketani) e di pollo (gruppo di Zylka), emerge che i geni da noi clonati appartengono alla famiglia *soul*, come testimoniato dalla presenza di domini amminoacidici caratteristici. L'analisi bioinformatica del genoma di altre specie conferma l'elevato grado di conservazione di questi geni, presenti in tutti gli organismi viventi presi in esame, a sostegno di un ruolo biologico fondamentale.

Da un punto di vista strutturale i *soul/hbp* sono geni che apparentemente codificano per proteine di membrana. Inoltre va sottolineato che *soulA* è un gene ad effetto materno.

Durante lo sviluppo embrionale entrambi i geni marcano diversi territori embrionali e citologici; il territorio anteriore nel quale si differenziano le cellule del sangue accomuna l'espressione di entrambi i trascritti in fase embrionale (foto 11)

Altra regione di co-espressione dei due ortologi è evidente nella regione posteriore dell'estensione del vitello. Nella zona del mesoderma caudale del tronco, nei somiti più giovani, si è riscontrato un'ulteriore similitudine di espressione. Al di là degli aspetti conservati, che lasciano ipotizzare meccanismi di complementarietà o ridondanza, *soulA* e *soulB* divergono per altri aspetti: prima di tutto *soulB* presenta un dominio di espressione nei dotti pronefrici a 24 hpf,

dominio che si estende anteriormente (72hpf) (foto 11). Inoltre, a differenza di *soulA*, *soulB* non è mai espresso nella regione della testa.

Da un iniziale studio della funzione in vivo delle proteine SOULA e SOULB emerge che la loro inibizione provoca anomalie nel differenziamento del sangue e del tronco, e nella forma del vitello; in dettaglio, mentre l'inibizione separata di entrambe le proteine induce una ridotta sintesi dell'emoglobina, l'inibizione della sola proteina SOULB causa un fenotipo anche a carico del tronco e del vitello.

In fine lo studio del rapporto epistatico tra i geni *soul/hbp* con *DMT1*, *ferroportina 1* e *TFR1* nei rispettivi mutanti, ha mostrato che la normale trascrizione sia di *soulA* che di *soulB* necessita di una proteina TFR1 funzionale. In particolare, è possibile immaginare che il ferro trasportato da TFR1 agisca direttamente o indirettamente sull'espressione dei geni *soul/hbp* per cui, in assenza della funzione di *tfr1*, i geni *soul/hbp* non si attivano per mancanza di ioni o fattori responsabili della loro trascrizione. Un'ipotesi ancor più interessante vede i geni *soul/hbp* direttamente implicati nel meccanismo di azione del recettore della transferrina, come recettore che ingloba transferrina-ferro per consentire al rilascio del ferro al mitocondrio per la sintesi di eme e quindi di emoglobina. Gli ortologi *soul/hbp* non subiscono nessuna modifica trascrizionale in embrioni mutanti per il gene *ferroportina 1*. A differenza di *soulA*, *soulB* non è espresso nei dotti pronefrici di embrioni mutanti per il gene *DMT1*, mantenendo tuttavia l'attività nelle cellule del sangue.

In base a questi dati preliminari possiamo affermare che i due ortologi *soul/ heme binding protein* sono implicati nel metabolismo del ferro durante la sintesi dell'eme.

Ovviamente, molto ancora c'è da fare per acquisire ulteriori prove circostanziali relative a quanto ipotizzato, come usare morfolino diversi da quelli impiegati, che possano più efficacemente inibire la funzione di *soulA* e *soulB*. Per approfondire le osservazioni di carattere funzionale sarà inoltre necessario studiare l'effetto sullo

sviluppo e sull'assimilazione di ferro/eme della microiniezione dell'mRNA sintetico, esperimento di "gain-of-function". Altrettanto cruciale per verificare la specificità dei morfolino, sarà il recupero del fenotipo a carico degli eritrociti e dei somiti mediante coiniezione del morfolino con l'mRNA del gene corrispondente. In fine, l'esposizione farmacologica degli embrioni di zebrafish a succinylacetone e indomethacina, sostanze che favoriscono o bloccano l'assimilazione del ferro, potrebbe fornire ulteriori indicazioni su un ipotetico ruolo del ferro libero sulla regolazione trascrizionale dei geni *soulA* e *soulB*. Come riportato da studi di insetti (x), dove il gene *soul/hbp* svolge un ruolo importante nella proliferazione degli oociti, dato che non ci meraviglia in quanto sia *soulA* che *soulB* hanno l'ovario come dominio di attività trascrizionale, i suddetti approcci farmacologici alterano l'espressione di *hbp*.

soulA

soulB

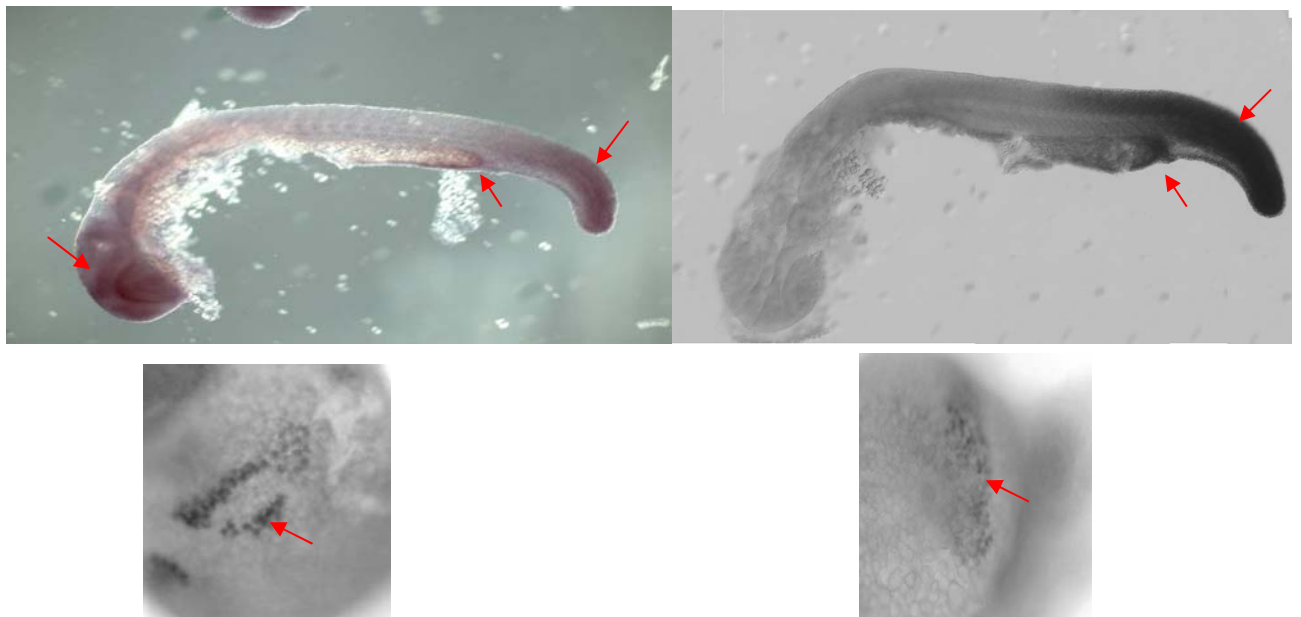


Foto11 : confronto tra l'attività trascrizionale di diversi territori embrionali e citologici di *soulA* e *soulB*

Bibliografia

- 1) **Mackay T.**: The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Reviews of Genetics* **35**: 303-339, 2001.
- 2) **Andrews N.C.; Bridges K.R.**: Hematology of infancy and Childhood. eds. *Nathan, D.G. Orkin S.H.*:423-461, W.B Saunders, 1997.
- 3) **Gutteridge J.M.C.; Rowley D.A.; Halliwell B.**: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. *Biochemical Journal* **199**: 263, 1981.
- 4) **Aisen P.**: The role of transferrin in iron transport. *Br .J. Haematol.* **26**:159-163,1974.
- 5) **Aisen P.**: The role of transferring metabolism and the liver. *Seminars in liver disease* **4**:192, 1994.
- 6) **Andrews N.C.**: Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* **341**: 1986-1995, 1999.
- 7) **Andrews N.C.**: Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Reviews* vol. **35**: 208-217, 2000.
- 8) **Matecalf D.**: The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoetic cell. *Nature* **339**: 27-30, 1989.
- 9) **Bridges K.R.; Seligman P.A.**: Principles and Practice of Hematology. *Blood*: 1433-1472, 1995.
- 10) **Gregory C.J.; Eaves A.C.**: Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: Definition of three erythroid colony responses. *Blood* **49**: 855-864, 1977.
- 11) **Tapperman A.D.; Curtis J.E.; McCulloch E.A.**: Erythropoietic colonies in cultures of human marrows. *Blood*: 659-669, 1974.
- 12) **Sieff C.A.; Williams D.A.**: Principles and Practice of Hematology. *Blood*: 171-224, 1995.
- 13) **Sassa S.; Kappas A.**: Principles and Practice of Hematology. *Blood*: 1338-1398, 1995.
- 14) **Cross J.C.; Werb Z.; Fisher S.J.**: Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* **266**: 1508-1518, 1994.
- 15) **Richards M.P.**: Trace mineral metabolism in the avian embryo. *Poult. Sci.*: **76**: 156-164, 1997.
- 16) **Craik J.C.**: Levels of calcium and iron in the ovaries and eggs of cod *Gadus morhua* L. and plaice *Pleuronectes platessa* L. *Comp Biochem. Physiol.A.*: **83**: 515-517, 1986.

- 17) **Dumont J.N.:** Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). IV. The route of injected tracer transport in the follicle and developing oocyte. *J. Exp Zool*: **204**, 193- 217, 1978.
- 18) **Mullner E.W.; Kuhn L.C.A.:** Stem-loop in 3'-untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* **53**: 815, 1988.
- 19) **Gunshin H.:** Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal- iron transporter. *Nature* **388**: 482-488, 1997.
- 20) **Aziz N.; Munro H.N.:** Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5'-untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **84**: 8478, 1987.
- 21) **Theil E.C.:** The iron responsive element (IRE) family of mRNA regulators. Regulation of iron transport and uptake compared in animals, plants and microorganism. *Met. Ions. Biol Syst* **35**: 403-434 1998.
- 22) **Eisenstein R.S.; Blemings K.P.:** Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *J. Nutr.* **128**: 2295- 2298, 1998.
- 23) **Taketani S.:** Acquisition, Metabolization and Utilization of cellular iron and Heme: Endless findings and growing evidence of tight regulation. *Tohoku J. Exp. Med.* **205**: 297-318, 2005.
- 24) **Hahn P.F.; Bale W.F.:** Radioactive iron absorption by the gastrointestinal tract: influence of anemia, anoxia, and antecedent feeding distribution in growing dogs. *J. Exp. Med.* **78**: 169-188, 1943.
- 25) **Neely M.N.; Pfeifer J.D.; Caparon M.:** Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infect Immun* **70**: 3904-14, 2002.
- 26) **Prouty M.G.; Correa N.E.; Barker L.P.; Jagadeeswaran P.; Klose K.E.:** Zebrafish-Mycobacterium marinum model for mycobacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **225**: 177-82, 2003.
- 27) **Taylor M.R.; Hurley J.B.; Van Epps H.A.; Brockerhoff S.E.:** A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A* **101**: 4584-9, 2004.
- 28) **Tomasiewicz H.G.; Flaherty D.B.; Soria J.P.; Wood J.G.:** Transgenic zebrafish model of neurodegeneration. *J Neurosci Res* **70**: 734-45, 2002.
- 29) **Ernest S.; Rauch G.J.; Haffter P.; Geisler R.; Petit C.; Nicolson T.:** Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for human hereditary deafness. *Hum Mol Genet* **9**: 2189-96, 2000.

- 30) **Bassett D.I.; Curie P.D.:** The zebrafish as model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2:** R265-70, 2003.
- 31) **Wang H.; Long Q.; Marty S.; Lin S.:** A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. *Nat Genet* **20:** 239-43, 1998.
- 32) **Kimmel C. B.; Baallard W.W.; Kimmel S.R.:** Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203:** 253-310, 1995.
- 33) **Brand M.; Heisenberg C.P.:** Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* **123:** 179-190, 1996.
- 34) **Nasevicius A.; Ekker S.C.:** Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nat. Genet* **26:** 216-220, 2000.
- 35) **Stainier D.Y.:** Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* **123:** 285-292, 1996.
- 36) **Goldsmith P.; Harris W.A.** The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. *Semin Cell Dev Biol* **14:** 11-18, 2003.
- 37) **Drummond I.A.:** Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutation affecting pronephric function. *Development* **125:** 4655-4667, 1998.
- 38) **Lawson N.D.; Weinstein B.M.:** Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat Rev Genet.* **3:** 674-682, 2002.
- 39) **Whitfield T.T.:** Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J Neurobiol* **53:** 157-171, 2002.
- 40) **Brownlie A.; Zon L.I.:** The zebrafish as a new model system for the study of hematopoiesis. *Bioscience* **49:** 382-392, 1999.
- 41) **Bahary N.; Zon L.I.:** Use of the zebrafish (*Danio rerio*) to define hematopoiesis. *Stem. Cells* **16:** 89-98, 1998.
- 42) **Detrich H.W.:** Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A* **92:** 10713-10717, 1995.
- 43) **Liao E.C.:** SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes & Development* **12:** 621-626, 1998.
- 44) **Al-Adhami M.A.; Kunz Y.W.:** Ontogenesis of haematopoietic sites in *brachydanio rerio*. *Develop. Growth and Differ* **19:** 171-179, 1977.
- 45) **Rieb J.P.:** La circulation sanguine chez l’embryon de *Brachydanio rerio*. *Annales d’embryologie et de Morphogenese* **6**, 1973.

- 46) **Ransom D.G.:** Characterization of zebrafish mutants with defect in embryonic hematopoiesis. *Development* **123**: 311-319, 1996.

- 47) **Sato E.; Sagami I.; Uchida T.; Sato A.; Kitagawa T.; Igarashi J.; Shimizu T.:** SOUL in Mouse Eyes Is a New Hexameric Heme-Binding Protein with Characteristic Optical Absorption, Resonance Raman Spectral, and Heme-Binding. *Biochemistry* **43**: 14189-14198, 2004.

- 48) **Zylka M.J.; Reppert S.M.:** Discovery of a putative heme-binding protein family (SOUL/HBP) by two-tissue suppression subtractive hybridization and database searches. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **74**: 175-181, 1999.

- 49) **Donovan A.; Brownlie A.; Dorschner O.M.; Zhou Y.; Shepard J.; Pratt S.J.; Paw B.H.; Phillips R.B.; Thisse C.; Thisse B.; Zon L.I.:** Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**: 776-780, 2000.

- 50) **Donovan A.; Brownlie A.; Dorschner O.M.; Zhou Y.; Pratt S.J. ;Paw B.H.; Phillips R.B.; Thisse C.; Thisse B.; Zon L.I.:** The zebrafish mutant gene chardonnay (cdy) encodes vivalental metal transporter 1 (DMT1). *Blood* **100**: 4655-4659 ,2002.

- 51) **Wingert R.A.; Brownlie A.; Galloway J.L.; Dooley K.; Fraenkel P.; Axe J.L.; Davidson A.J.; Barut B.; Noriega L.; Sheng X.; Zhou Y.; Tübingen 2000 Screen Consortium; Zon L.I.:** The chianti zebrafish mutant provides a model for erythroid-specific disrupt of transferring receptor 1. *Development and disease* **131**: 6225-6235, 2004.

- 52) **Taketani S.; Adachi Y.; Kohno H.; Ikehara Y.; Tokunaga R.; Ishii T.:** Molecular Characterization of a Newly Identified Heme-binding Protein Induced during Differentiation of urine Erythroleukemia Cells. *The journal of biological chemistry* **273** 47, 31388–31394, 1998.

- 53) **William D.III H.; Westerfield M.; Zon L. I.:** The Zebrafish Biology. Vol **59**, 1999.

- 54) **Drummond I. A.:** The zebrafish pronephros: a genetic system for studies of kidney development. *Developmental Biology Review* **14**: 428-435, 2000.

- 55) **Lyons S.E.; Lawson N.D.; Lei L.; Bennett P.E.; Weinstein B.M.; Liu P.P.:** A nonsense mutation in zebrafish *gata 1* causes the bloodless phenotype in *vlad tepes*. *PNAS* **99**: 5454-5459, 2002.

- 56) **Machado E.A.;Oliveira P.L.; Moreira M.F.; de Souza W.; Masuda H.:** Uptake of *Rhodnius* Heme-Binding Protein (RHBP) by the Ovary Of *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **39**:133-143, 1998.
- 57) **Braz G.R.C.; Abreu L.; Masuda H.; Oliveira P.L.:** Heme biosynthesis and oogenesis in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**: 359-364, 2001.
- 58) **Brownlie A.; Donovan A.; Pratt S.J. ; Paw B.H.; C.Oates A.; Brugnara C.; Witkowska H.E.; Sassa S.; Zon L.I. :** Positional cloning of the zebrafish *sauternes* gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nature genetics* **20**:244-250,1998

